



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 <b>C07K 14/52, C12N 15/19, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/24, C12P 21/08, G01N 33/53</b>		A1	(11) 国際公開番号 <b>WO97/12914</b>
			(43) 国際公開日 <b>1997年4月10日(10.04.97)</b>
<p>(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP96/02851</b></p> <p>(22) 国際出願日 <b>1996年10月1日(01.10.96)</b></p> <p>(30) 優先権データ            特願平7/259067 1995年10月5日(05.10.95)            特願平8/41965 1996年2月28日(28.02.96)         </p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)            塩野義製薬株式会社(SHIONOGI &amp; CO., LTD.)[JP/JP]            〒541 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番8号 Osaka, (JP)         </p> <p>(72) 発明者: および            (73) 発明者／出願人 (米国についてのみ)            北浦基次(KITAURA Motoji)[JP/JP]            〒561 大阪府豊中市服部豊町二丁目12-21 Osaka, (JP)            中島俊洋(NAKAJIMA, Toshihiro)[JP/JP]            〒560 大阪府豊中市長興寺北三丁目13-31-303 Osaka, (JP)            原田重徳(HARADA, Shigenori)[JP/JP]            〒565 大阪府吹田市高野台一丁目6-2-601 Osaka, (JP)         </p>		JP	<p>(74) 代理人            弁理士 山本秀策(YAMAMOTO, Shusaku)            〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号            クリスタルタワー15階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE,            GE, HU, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX,            NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO特            許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY,            KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 歐州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES,            FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ,            CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>
			<p>添付公開書類  <b>国際調査報告書</b></p>

(54)Title: NOVEL HUMAN CC CHEMOKINE

(54)発明の名称 新規ヒトCCケモカイン

(57) Abstract

A peptide which is a human homologue of guinea pig eotaxin or a novel chemokine, in particular, a human CC chemokine having an activity on human eosinophils; the structural gene of the peptide; an expression vector having the gene; a transformant having the expression vector introduced thereto; a process for producing the peptide by using the transformant; a monoclonal antibody against the peptide; a method for assaying the peptide by using the monoclonal antibody; and a method for screening an agonist or antagonist of the peptide.

(Lindley, I. J. D. ら、*Immunol. Today*, 14, 24 (1993))。

ケモカインの4つのシステイン残基は、第1と第3の残基間および第2と第4の残基間でそれぞれジスルフィド結合している。第1と第2とのシステイン残基間に別のアミノ酸を1つ含むか否かで生物活性に特徴が認められるので、それぞれのサブファミリーをCXCケモカインおよびCCケモカインと呼んで区別している (Baggiolini, M. ら、*Ad. Immunol.*, 55, 97-179 (1994))。これまでに発見されたCXCケモカインは、IL-8/NAP-1 (Schmid, J. ら、*J. Immunol.*, 139, 250-256 (1987))、NAP-2 (Walz, A. ら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 969-975 (1989))、NAP-4、GRO $\alpha$  (Richmond, A. ら、*J. Cell. Biochem.*, 36, 10 185-198 (1988))、GRO $\beta$  (Haskill, S. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 7732-7736 (1990))、GRO $\gamma$  (Haskill, S. ら、(1990) 前出)、GCP-2 (Proost, P. ら、*J. Immunol.*, 150, 1000-1010 (1993))、ENA-78 (Walz, A. ら、*J. Expt. Med.*, 174, 1355-1362 (1991))、PF-4 (Deuel, T. F. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 2256-2258 (1977))、およびIP-10 (Dewald, B. ら、*Immunol. Lett.*, 32, 81-84 (1992)) であり、そしてCCケモカインは、MCP-1 (Yoshimura, T. ら、*J. Immunol.*, 142, 1956-1962 (1989))、MCP-2 (Chang, H. C. ら、*Int. Immunol.*, 1, 388-397 (1989))、MCP-3 (Van Damme, J. ら、*J. Exp. Med.*, 176, 59-65 (1992))、MIP-1 $\alpha$  (Obaku, K. ら、*J. Biochem.*, 99, 885-894 (1986))、MIP-1 $\beta$  (Lipes, M. A. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 9704-9720 08 (1988))、RANTES (Schall, T. ら、*J. Immunol.*, 141, 1018-1025 (1988))、およびI-309 (Miller, M. D. ら、*J. Immunol.*, 143, 2907-2916 (1989)) である。ほとんどのCXCケモカインは好中球を遊走させて単球を遊走させないが、逆にCCケモカインは単球を遊走させて好中球を遊走させない。他の白血球である好酸球、好塩基球、リンパ球については、それぞれ一部のCXCおよびCCケモカインに遊走活性が報告されている。ヒト好酸球の遊走活性としては、CCケモカインのRANTESが最強であり、次にMIP-1 $\alpha$ が強く、そしてCXCケモカインであるIL-8においても弱く認められているが、いずれも好酸球に特異的な走化因子ではない。

最近、喘息発症モルモットの肺に強く発現している好酸球の走化因子であるエ

## 明細書

## 新規ヒトCCケモカイン

## 5 技術分野

本発明は、ヒト好酸球に対して活性を有するペプチド；該ペプチドの構造遺伝子；該遺伝子を有する発現ベクター；該発現ベクターを導入した形質転換体；該形質転換体を用いる該ペプチドの製造方法；該ペプチドに対する単クローナン抗体；該単クローナン抗体を用いる該ペプチドの測定方法；および、該ペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする方法に関する。

## 背景技術

細菌またはウイルスによる感染、物理的または化学的な外傷、自己免疫疾患、アレルギー性疾患などが原因で組織障害が起こると、発赤、浮腫、発熱、疼痛などの兆候を伴う炎症反応が惹起され、炎症局所に末梢白血球の集積および浸潤が観察される。白血球は、疾患によって炎症部位に浸出する種類が異なっている。通常の細菌感染、免疫複合体の沈着、外傷などの急性炎症では主に好中球が、結核菌感染、チフス菌感染、および遅延型過敏症では主に単球が、ウイルス感染では主にリンパ球が集積および浸潤し、そして好酸球および好塩基球は即時型アレルギーまたは寄生虫感染に伴って浸出する (Baggiolini, M. ら, Immunol. Today, 15, 127-133 (1994))。このような白血球を遊走させる因子として、C5a、LTB4 (ロイコトリエンB4)、MLP (N-ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン)、PAF (血小板活性化因子) などが報告されている。しかし、これらの古典的走化因子は、遊走する白血球に対する特異性はない (Ahuja, S. ら, Immunol. Today, 15, 281-287 (1994))。

近年、遊走する白血球に対してある程度の選択性を有し、特徴的な4つのシステイン残基を有するポリペプチドの走化因子が発見された。これらは、アミノ酸配列に相同意義があり、生物活性にも関連性のあるファミリーであるため、ケモカイン (chemokine : chemoattractant and cytokine activity) と命名されている

を上昇させる。

好ましい実施態様によれば、上記ペプチドは、ヒト小腸に由来する。

本発明のDNA分子は、上記いずれかに記載のペプチドをコードする。

好ましい実施態様によれば、上記DNA分子は、配列表の配列番号1の168位のGから389位のAまででなる塩基配列を有する。

好ましい実施態様によれば、上記DNA分子は、配列表の配列番号1の99位のAから389位のAまででなる塩基配列を有する。

好ましい実施態様によれば、上記DNA分子は、配列表の配列番号1の1位のGから859位のAまででなる塩基配列を有する。

10 本発明の発現ベクターは、上記いずれかに記載のDNA分子を有する。

本発明の形質転換体は、上記発現ベクターを宿主に導入して得られる。

好ましい実施態様では、上記宿主は昆虫細胞、特にカイコ由来細胞株である。

本発明のペプチドの製造方法は、上記形質転換体を培養してペプチドを產生する工程、および產生されたペプチドを培養培地から回収および精製する工程を包含する。

本発明の単クローニング抗体は、上記ペプチドに対するものである。

本発明のペプチドの測定方法は、上記単クローニング抗体を用いることを特徴とする。

20 本発明のペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする方法は、該アゴニストまたはアンタゴニストを含むと推定される試料と該ペプチドに特異的なレセプターとを反応させ、その結合性および／または反応性を測定する工程を包含する。

#### 図面の簡単な説明

25 図1Aおよび図1Bは、それぞれヒトの各組織における、本発明のヒトエオタキシンのmRNAの発現についてのノーザンプロット分析の結果を示す。

図2は、本発明のヒトエオタキシンペプチドと既報のCCケモカインとのアミノ酸配列の比較を示す図である。

図3は、本発明のヒトエオタキシンペプチドおよび既報のMCP-3ペプチドまた

オタキシン (eotaxin) がクローニングされた (Jose, P. J. ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 205, 788-794 (1994))。これは好中球を遊走させないCCケモカインである。

また、ヒト好酸球の遊走活性を有するケモカインのレセプターについて、種々の研究が行われており、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-3、およびRANTESに特異的なレセプターであるCC CKR1、MCP-1に特異的なレセプターであるCC CKR2A、MCP-1およびMCP-3に特異的なCC CKR2B、ならびに、これらのケモカインに特異的ではないレセプターであるCC CKR3が報告されている (Combadiere, C. ら、J. Biol. Chem., 270, 16 491-16494 (1995))。

10

#### 発明の開示

モルモットの好酸球走化因子エオタキシンがクローニングされたので、そのアミノ酸配列に基づいて、まず、モルモットエオタキシンのcDNAをクローニングし、これをプローブとしてヒトゲノムDNAライブラリーから白血球走化因子CCケモカインの新規DNA断片をクローニングした。次に、得られたDNA断片をプローブに用いてノーザンプロット分析した結果、この新規CCケモカインがヒト小腸に多く発現していることが見出された。そこで同じプローブを用いてヒト（小腸）cDNAライブラリーからその新規CCケモカインの全長cDNAをクローニングし、これをヒトエオタキシンと命名した。次いで、ヒトエオタキシン遺伝子を昆虫細胞で発現させて、このヒトエオタキシンペプチドが、ヒト好酸球の細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明のペプチドは、配列表の配列番号1の24位のGlyから97位のProまでのアミノ酸配列またはその類似の配列を含む。

25 好ましい実施態様によれば、上記ペプチドは、配列表の配列番号1の1位のMetから97位のProまでのアミノ酸配列またはその類似の配列を含む。このうち、配列表の配列番号1の1位のMetから23位のAlaまでのアミノ酸配列は、シグナルペプチドであると考えられる。

好ましい実施態様によれば、上記ペプチドは、ヒト好酸球内のカルシウム濃度

化されたアミノ酸または塩基を含んでいてもよい。

(I I) 本発明のヒトエオタキシンペプチドまたはDNA分子の単離または同定に用い得る方法

本発明の各工程において用い得る一般的な分子生物学的実験手法 (DNAの電気泳動、電気泳動分離したDNAをゲル中から回収する方法、ライゲーション、宿主の形質転換、組換え宿主の培養、プラスミドDNAの調製、DNAの制限酵素による切断、DNAの放射標識など) は、例えばMolecular Cloning 第2版 (Maniatisら、Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)) に記載されているような、当業者に公知の方法が採用される。

10 以下に本発明のヒトエオタキシンペプチドまたはDNA分子の単離または同定に用い得る一般的方法を述べる。

(1) モルモットのエオタキシンcDNAのクローニング

(A) プライマーの合成

報告されているモルモットのエオタキシンのアミノ酸配列 (配列表の配列番号15 2)に基づいて、例えば、第1と第2のシステインを含む領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対する正方向の縮重プライマー、および第4のシステインを含む領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対する逆方向の縮重プライマーを、いずれも5'側に適切な制限酵素部位を付加して、DNA合成機を用いて合成し得る。

20 (B) モルモット胸腺細胞からのmRNAの精製

モルモットの胸腺を摘出して、胸腺細胞を遊離し、適切な培地に懸濁する。これに、例えばフィトヘムアグルチニン-P (PHA-P)などを加えて胸腺細胞を刺激して培養した後、胸腺細胞を洗浄し、例えば市販のmRNA精製用キットを用いてmRNAを精製し得る。

25 (C) モルモットのエオタキシンcDNA断片のクローニング

モルモット胸腺細胞から得られた精製mRNAを用いて、例えば市販のキットにより一本鎖cDNAを合成し得る。この一本鎖cDNAを鑄型とし、上記(A)項で得られるプライマー、および耐熱性DNAポリメラーゼを用いて、PCR反応を行う。次いで、得られた反応液を制限酵素で処理し、低融点アガロー

はIL-8の、ヒト好酸球、単球、および好中球に対する活性（細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性）についてのそれぞれの結果を示すグラフである。

図4は、本発明のヒトエオタキシンペプチドまたは既報のケモカインの、CCケモカインレセプターCC CKR1、CC CKR2B、またはCC CKR3発現293T細胞株に対する活性（細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性）についてのそれぞれの結果を示すグラフである。

図5は、本発明のヒトエオタキシンペプチドおよび既報のケモカインの、CCケモカインレセプターCC CKR3発現K562細胞株に対する活性（細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性）についての結果を示すグラフである。

10

## 発明を実施するための最良の形態

### (I) 定義

本発明を説明する上で用いられる用語を説明する。

「ケモカイン」とは、白血球が炎症反応局所へ走化性を示すための誘引物質のうち、遊走する白血球に対してある程度の選択性を有し、特徴的な4つのシステイン残基を有するポリペプチドのファミリーをいう。これらはアミノ酸配列および生物活性に関連性がある。ケモカインの4つのシステイン残基は、第1と第3の残基間および第2と第4の残基間でそれぞれジスルフィド結合している。第1と第2のシステイン残基間に別のアミノ酸を含まないケモカインを「CCケモカイン」、別のアミノ酸を1つ含むケモカインをCXCケモカインとして区別している。一般に、CCケモカインは単球を遊走させて好中球を遊走させず、CXCケモカインは好中球を遊走させて単球を遊走させないことが知られている。本発明の新規ヒトCCケモカインであるヒトエオタキシンペプチドは、ヒト好酸球の細胞内カルシウム濃度を上昇させる活性を有している。

アミノ酸配列またはDNA配列に「類似の配列」とは、特定の配列に必ずしも限定されることはなく、この配列に加えて当業者に公知の置換、挿入、欠失などを含み、そしてコードされるペプチドの機能または活性が実質的に同じ程度である改変を含む配列をいう。あるいは、ペプチドの機能または活性が実質的に同じ程度であるならば、化学的または生化学的な改変、あるいは非天然または誘導体

得られたシングルコロニーの菌体からアルカリSDS法によりプラスミドDNAを調製し、例えばアルカリ変性法（NaOHで処理した後、酢酸アンモニアで中和してエタノール沈殿する）で処理して、一本鎖プラスミドDNAを調製する。これを鋳型として、モルモットエオタキシンの翻訳領域を含むcDNAの塩基配列を、  
5 例えばジデオキシ法により決定し得る。この結果、配列表の配列番号4に示すモルモットエオタキシンcDNAが得られる。

(2) ヒトエオタキシンゲノムDNAのクローニング

(A) プローブの作製

上記(1)項で得られ得るモルモットエオタキシンcDNAの塩基配列に基づいて、適切な正方向および逆方向のプライマーを合成し、次のPCRに用いる。  
10 上記(D)項で得られ得るモルモットエオタキシンの一本鎖プラスミドDNAを鋳型とし、Taqポリメラーゼを用いてPCR反応を行い、アガロース電気泳動で分離し、目的のサイズ（約330bp）のDNAバンドを切り出し、DNA断片を精製し得る。このDNA断片を<sup>32</sup>Pなどで標識し、これをプローブとして用い得る。

15 (B) ヒトゲノムライブラリーのクローニング

まず、ファージベクターに組み込んだ適切なヒトゲノムライブラリー（例えば、ヒトリンパ球ゲノムライブラリー、ヒト胎盤ゲノムライブラリー、ヒト脳ゲノムライブラリー）を大腸菌に感染させ、1次スクリーニングとして、プレートに播いてブラークを形成させた後、ナイロンメンプランにトランスファーする。この  
20 メンプランをプレハイブリダイゼーションした後、上記(A)項で得られ得るプローブとハイブリダイズする。メンプランを洗浄した後、放射活性を検出し、シグナルを生じる陽性のブラークを選択し得る。ここで選択したファージDNAについて、既報の塩基配列(MCP-1、MCP-3など)の翻訳領域に対するPCRを行って、既報の塩基配列（すなわち増幅され得る配列）を有するブラークを除去する。  
25 次いで、既報の塩基配列を含まないファージについて、逐次希釀して2次および3次のスクリーニングを行うことにより、シングルクローンを選択し得る。すなわち、ファージDNAについて、種々の制限酵素で切断してアガロース電気泳動で分離し、バンドのパターンが同じものは同一クローンとし、同様のハイブリダイゼーションを繰り返して、できるだけ小さいサイズの陽性バンドを与えるよう

スゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ（約150bp）のDNAバンドを切り出し、そしてDNA断片を精製し得る。得られたDNA断片を、配列決定用のベクター（例えばpBluescript KS(+)ベクター、pUC19ベクター）などに挿入することにより、この挿入DNAの塩基配列を、例えばジデオキシ法により部分的に配列決定し得る。この結果、配列表の配列番号3に示すDNA配列が得られる。

5 (D) モルモットのエオタキシンcDNAのクローニングおよび塩基配列の決定

上記（B）項で得られた精製mRNAから、cDNAを合成して適切なクローニングベクターに挿入する。得られたプラスミドを大腸菌、酵母などに導入して、  
10 cDNAライブラリーを調製し得る。このcDNAライブラリーからエオタキシンcDNAをクローニングするために、PCR法により1次および2次スクリーニングを行い得る。このスクリーニングにおいて、上記（C）項で得られるモルモットのエオタキシンcDNA断片の塩基配列（配列表の配列番号3）に基づいて、適切なプライマーを合成して用いることができる。1次スクリーニングでは、  
15 まず、cDNAライブラリーを、例えば96穴プレートに分注して培養し、これを鑄型としてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動で分離して、目的のクローンを含むプールでは約100bpのDNAを増幅し得る。2次スクリーニングでは、1  
次スクリーニングでDNAが増幅したプールについて、さらに小さいプールに分け、これを鑄型としてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動で分離し得る。その結果、目的のバンドの増幅が認められたプールを選択する。これについて、さらに3次スクリーニングをコロニーハイブリダイゼーション法などで行い得る。  
20 例えば、選択したコロニーから菌体を探り、適切な培地に懸濁し、これをプレートに播いて培養し、そしてナイロンメンプランにトランスファーする。このメンプランをプレハイブリダイゼーションした後、例えば<sup>32</sup>P、フルオレセインなどで標識したエオタキシンDNA断片を加えたハイブリダイゼーション液に浸してハイブリダイズする。次いでメンプランを洗浄した後、放射活性を解析する。次に4次スクリーニングとして、シグナルの得られたコロニーを各プレートから選んで菌体を探り、適切な培地に懸濁し、これをプレートに播いて培養することにより、シングルコロニーの菌体を得ることができる。

例えば、pGEM3SR $\alpha$ dhfr、pEF-BOS、pVL1392、pMAL-C2などに組み込んで、ヒトエオタキシンペプチドを発現するための発現ベクターとし得る。

この発現ベクターを、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞に導入して、形質転換体が作成される。この形質転換体を培養することにより、本発明の  
5 ヒトエオタキシンペプチドが産生され得る。このようにして得られたヒトエオタキシン遺伝子培養物は、アフィニティーカラム法、イオン交換カラム法、ゲル通過カラム法などにより精製され得る。

#### (6) ヒトエオタキシンペプチドのヒト白血球に対する生物活性の測定

白血球の走化性については、白血球が走化因子と接触すると形態変化を起こし、  
10 走化因子の濃度の高い方向へ直線的な運動を行うことが知られている。すなわち、白血球膜上の受容体に走化因子が結合すると、該白血球の局所的な膜電位変化が生じ、細胞内カルシウムイオンの上昇が生じる。その結果、代謝速度の増加およびcAMP濃度の上昇とともに、微小管およびアクチン繊維の細胞内での存在場所または存在形態に大きな変化が生じ、受容体の移動および局在化とともに、運動型白血球へ形態するとされる。  
15

そこで、白血球の細胞内カルシウムイオン濃度の変化を、例えば、ヒト好酸球について以下のようにして測定し得る。ヒト好酸球懸濁液に、細胞内カルシウムイオンにより影響を受けるような蛍光試薬（例えば、Fura-2/AMなど）を加え、ブレインキュベートする。次いで、得られた好酸球懸濁液に、試験液を加えたときの蛍光度の変化を、蛍光分光光度計を用いて測定し得る。このようにして測定した結果、本発明のヒトエオタキシンペプチドは、ヒト好酸球に対して、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有することがわかった。また、ヒト単球および好中球に対して同様の実験をした結果、細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性はなかった。

25 遺伝子の組換えにより樹立したヒトCCケモカインレセプター発現細胞についても、同様にして、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定し得る。測定の結果、本発明のヒトエオタキシンは、CC CKR3発現細胞に対して特異的に細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有することがわかった。

#### (7) 抗ヒトエオタキシン抗体の作製

に、制限酵素で切断する。選択した陽性DNA断片を、pBluescript KS(-)ベクターなどの適切なベクターに挿入し、例えばジデオキシ法により塩基配列を決定し得る。そしてこの配列を、例えば、GenBank/EMBL/DDBJ DNA配列データベースに対して核酸ホモロジー検索を行い得る。この検索の結果、新規のcDNAクローンを1つ単離し得る。このようにして得られたクローン141は、新規のヒトCCケモカインであることが明らかになり、これをヒトエオタキシンと命名した。本発明のヒトエオタキシンのcDNA配列は、配列表の配列番号1に示すとおりである。

#### (3) ヒトエオタキシンcDNAのクローニング

10 本発明のヒトCCケモカインであるヒトエオタキシンは、小腸で多く発現しているので、例えば、ヒト小腸cDNAライブラリーを大腸菌、酵母などに導入し、適当なプローブを用いて、スクリーニングを行ってシングルクローンを選択し得る。得られたクローンについて、ファージDNAをプラスミドDNAに挿入し、挿入DNAの塩基配列を決定し得る。その結果、ヒトゲノムライブラリーから推定した配列と一致するヒトエオタキシンの塩基配列（配列表の配列番号1）が得られた。

#### (4) ヒトエオタキシンのアミノ酸配列のホモロジー解析

上記のようにして得られたヒトエオタキシンの塩基配列に基づいて推定したアミノ酸配列（配列表の配列番号1）は、ケモカインに特徴的な4つのシステイン残基を含み、第1と第2とのシステイン残基間に別のアミノ酸を含まないCCケモカインであると推定された。そのアミノ酸配列について、例えば、Genbank、EMBLなどのデータベースに対してDNASIS（日立）などのプログラムを用いて、ホモロジー検索を行い得る。既知のヒトCCケモカインおよびモルモットエオタキシンの配列と比較した結果、MCP-1、MCP-2、およびMCP-3が最も類似しており（相同率64～65%）、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、I-309、およびRANTESとは32～36%の相同率であることがわかった。また、モルモットエオタキシンとは57%の相同率であった。

#### (5) ヒトエオタキシンペプチドの発現

本発明のヒトエオタキシンペプチドをコードする遺伝子を、適当なベクター、

mRNAはまた、mRNAを逆転写酵素でcDNAに変換した後、適当なプライマーの組み合わせによるPCR法によつても検出し得る。ペプチドについては、上記(7)項で得られるヒトエオタキシン特異的な抗体を用いる通常の免疫沈降法またはウエスタンプロット法により確認し得る。

5 本発明のヒトエオタキシンについてノーザンプロット分析すると、mRNAのバンドの濃さから、小腸および結腸で多く発現していることが明らかになった。

#### (9) ヒトエオタキシンペプチドの免疫学的定量法

ヒトエオタキシンペプチドの測定は、例えば以下のようにして行い得る。例えば、放射性同位元素、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼなどの酵

10 素、あるいは蛍光色素などで標識した一定量のヒトエオタキシンペプチドに、既知濃度の非標識ヒトエオタキシン、および血清由来の抗ヒトエオタキシンポリクローナル抗体または単クローナル抗体を加えて、抗原抗体競合反応を行わせる。非標識抗原の濃度を適当に変化させた後、抗体に結合した標識抗原と抗体に結合していない標識抗原とを適当な方法で分離して、抗体に結合した標識抗原の放射能  
15 量、酵素活性、または蛍光強度を測定する。非標識抗原量が増加するにつれて抗体に結合する標識抗原の量は減少するので、この関係をグラフにして標準曲線を得る。また、ヒトエオタキシンペプチド上の異なるエピトープを認識する2種類の単クローナル抗体の一方を固相化し、他方を上記のいずれかの方法で標識し、固相化抗体に結合したヒトエオタキシンの量を標識抗体で検出定量する方法（サン  
20 ドイッチ法）も可能である。

次いで、上記反応系に濃度既知の非標識抗原の代わりに未知量の抗原を含む試料を加え、この反応後に得られる放射能、酵素活性、または蛍光強度を標準曲線に当てはめれば、試料中の抗原の量を測定し得る。

#### (10) ヒトCCケモカインレセプター発現ベクターの構築

25 既報のヒトCCケモカインレセプターであるCC CKR1、CC CKR2B、およびCC CKR3の遺伝子（Combadiere, C. ら、前出）をクローニングするために、例えば、ヒト単球細胞株THP-1のcDNAまたはヒトゲノムDNAを鑄型として用いてPCR法を行い得る。既報の塩基配列に基づいて、例えば、所望のケモカインレセプターのコーディング領域の両端部分をプライマーとして選択し得る。PCR

本発明のヒトエオタキシンペプチドに対する抗体は、例えば、推定されるヒトエオタキシンペプチドのアミノ酸配列の一部に基づいて通常のペプチド合成機で合成した合成ペプチド、またはヒトエオタキシンを発現するベクターで形質転換した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などにより產生されたヒトエオタキシンペプチドを通常のタンパク質化学的方法で精製して得られるペプチドを、免疫原として用いて、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの動物を免疫して、その血清由来の抗体（ポリクローナル抗体）を作製し得る。あるいは、免疫したマウスまたはラットの脾臓またはリンパ節から細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合させて、KohlerおよびMilsteinの方法（Nature, 256, 495-497 (1975)）またはその改良法であるUedaらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4386-4390 (1982)）に従ってハイブリドーマを作製した後、このハイブリドーマから単クローン抗体を產生させ得る。例えば、以下の工程によりヒトエオタキシンペプチドの単クローン抗体を得ることができる。

- 15 (a) ヒトエオタキシンペプチドによりマウスを免疫する工程、  
(b) 免疫マウスの脾臓を摘出して脾臓細胞を分離する工程、  
(c) 分離された脾臓細胞とマウスマイエローマ細胞とを、融合促進剤（例えば、ポリエチレングリコール）の存在下で、上記Kohlerらに記載の方法によって融合する工程、  
20 (d) 非融合マイエローマ細胞が成長しない選択培地で得られたハイブリドーマ細胞を培養する工程、  
(e) ELISA法および免疫電気移転法などにより所望の抗体を產生するハイブリドーマ細胞を選択し、限界希釈法などによりクローニングする工程、および  
(f) 抗ヒトエオタキシン単クローン抗体を產生するハイブリドーマ細胞を培養し、および単クローン抗体を回収する工程。
- 25 (g) ヒトエオタキシンのmRNAおよびペプチドの検出

本発明のヒトエオタキシンのmRNAおよびペプチドの存在は、通常の特異的なmRNAおよびペプチドの検出法を用いて行い得る。例えば、mRNAは、アンチセンスRNAまたはcDNAをプローブとして用いた、ノーザンプロット分析またはインサイチュハイブリダイゼーション法により検出し得る。あるいは、

エオタキシンペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを含むと推定される試料について行うことによって、本発明のヒトエオタキシンペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニングを行うことができる。例えば、本発明のヒトエオタキシンに特異的なレセプターの発現細胞、すなわちCC CKR3発現細胞<sup>5</sup>を、上記試料とともに、適切な条件下でインキュベートする。その結果、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる生物活性を有する場合は、試料はアゴニストを含み得る。また、生物活性を有さないが結合活性を有する場合は、試料はアンタゴニストを含み得る。あるいは、上記試料をレセプター発現細胞およびヒトエオタキシンとともにインキュベートして、ヒトエオタキシンの生物活性および/10または結合活性に影響を及ぼす場合、すなわち活性を阻害する場合、この試料はヒトエオタキシンのアゴニストまたはアンタゴニストを含み得る。

### 実施例

#### [実施例1] モルモットのエオタキシンc DNAのクローニング

##### 15 (1) プライマーの合成

モルモットのエオタキシンのアミノ酸配列 (Jose, P. J. ら、J. Exp. Med., 179, 881-887 (1994)) (配列表の配列番号2)に基づいて、第1および第2のシステインを含む領域 (配列表の配列番号2の4位のIleから10位のPheまで) のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対する正方向の縮重プライマーf42 (配列表の配列番号5)、第4のシステインを含む領域 (配列表の配列番号2の46位のLysから52位のProまで) のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対する逆方向の縮重プライマーr53 (配列表の配列番号6) を、いずれも5'側にEcoRI部位を付加して、DNA合成機 (Cyclone Plus、日本ミリポア) を用いて合成した。

##### 25 (2) モルモット胸腺細胞からのmRNAの精製

モルモット (Hartley、雄、4週齢) 1匹の胸腺を摘出して、胸腺細胞を遊離し、10%FCS (ウシ胎児血清) を含む20mlのRPMI 1640培地に懸濁した。これにPHA-P (シグマ、No. L9017) を最終濃度が5 μg/mlになるように加えて1時間培養した後、胸腺細胞をダルベッコPBS (-) (ニッスイ) で洗浄し、クイックプレッ

反応により得られた遺伝子断片を、例えばpCRII、pUC19、pBluescriptII KS(+)などの適当なクローニングベクター中に組み込んで増幅する。次いで、増幅した配列を、適切な制限酵素で切り出し、例えばpEF-BOS、pGEM3SR $\alpha$ dhfr、pREP9などの適当な遺伝子導入ベクター中に組み込んで、発現ベクターとし得る。

5 (11) ヒトCCケモカインレセプターの発現

上記(10)項で得られたヒトCCケモカインレセプターの発現ベクターを適切な制限酵素で処理し、フェノール／クロロホルム抽出ならびにエタノール沈殿を行った後、エレクトロポレーション法により、発現用の細胞、例えばヒト赤白血病細胞株K562細胞などへ発現ベクターを導入する。エレクトロポレーションにより形質転換した細胞を培養することにより、CCケモカインレセプターが発現し得る。

あるいは、ヒトCCケモカインレセプターの発現ベクターのDNAを、例えば蒸留水に溶解した後、塩化カルシウムを添加し、次いで、2×BBS溶液(50mM BE S(SIGMA)、280mM 塩化ナトリウム(ナカライトスク社)、および1.5mM リン酸水素二ナトリウム(ナカライトスク社))を添加した後、室温で25分間静置する。このように調製したDNA溶液を、例えばヒト胎児腎細胞株293T細胞を培養しているシャーレーに滴下し、35℃、3%炭酸ガス存在下で20時間培養して、細胞にDNAを導入する。DNA導入した細胞を培養することにより、CCケモカインレセプターが発現し得る。

20 (12) ヒトエオタキシンペプチドとCCケモカインレセプターとの結合実験

本発明のヒトエオタキシンペプチドを、例えばボルトンハンター試薬などを用いて<sup>125</sup>I標識し、あるいはアルカリホスファターゼなどの酵素で標識する。標識したヒトエオタキシンペプチドを、CCケモカインレセプター発現細胞、例えば、ヒト赤白血病細胞株K562細胞またはヒト胎児腎細胞株293T細胞の懸濁液に添加し、一定の温度でインキュベートする。洗浄後、細胞に結合したヒトエオタキシンペプチドの量を、標識量を測定することにより測定し得る。

(13) ヒトエオタキシンペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング

上記(6)項の生物活性および(12)項の結合活性の測定を、本発明のヒト

トリプトン32g、イーストエキストラクト20g、塩化ナトリウム5g、および1N NaOH 5mlを含む) 180μlを加えて37°Cで2晩培養した。次に、培養液50μlをストックし、残りの150μlの菌体を鋳型としてPCRを行って、アガロースゲル電気泳動で分離した。その結果、200のうち4つのプールで目的のサイズ(約100bp)のDNAバンドが増幅した。2次スクリーニングでは、1次スクリーニングで得られた3つのプールについて、ストック液1μlを2000倍希釈し、LB/Ampプレート(1L中、トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、塩化ナトリウム0g、およびアンピシリンナトリウム50mgを含む寒天培地)に1μlずつ50個スポットし、37°Cで1晩培養した。各プレートからコロニー30個ずつの菌体を探り、それを鋳型としてPCRを行って、アガロースゲル電気泳動で分離した。その結果、目的のバンドの増幅が認められたコロニーは各プレート(プール)に数個ずつ見られた。そのうち各プールにつき1個ずつのコロニーを選び、3次スクリーニングをコロニーハイブリダイゼーション法で行った。合計3個のコロニーから菌体を探り、それぞれスーパークロス培地1mlに懸濁し、LB/Ampプレートに約数百個のコロニーが生えるように播いて培養し、ナイロンメンプラン(Hybond-N+、アマシャム)にトランスファーした。そのメンプランをハイブリダイゼーション液(5×SSPE(0.9M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム pH 7.7、0.005M Na<sub>2</sub>EDTA)、10×デンハルト液、100μg/ml サケ精子DNA、2%SDS)に浸して65°Cで2時間プレハイブリダイゼーションした後、<sup>32</sup>P標識エオタキシンDNA断片(配列表の配列番号3に示すモルモットエオタキシンDNA断片25ngを、マルチプライムDNAラベリングシステム(アマシャム)を用いて<sup>32</sup>P標識した)を加えたハイブリダイゼーション液に浸して65°Cで1晩ハイブリダイズした。メンプランの洗浄は、0.1%SDSを含む2×SSC(0.3M NaCl、0.03M クエン酸ナトリウム)に浸して、室温で10分間を2回および65°Cで15分間を1回行った。このメンプランをバイオイメージアナライザー(Fuji)で解析した。4次スクリーニングとして、シグナルの得られたコロニーを各プレートから1個ずつ選んで菌体を探り、それスーパークロス培地に懸濁し、LB/Ampプレートに数十個のコロニーが生えるように播いて培養し、シングルコロニーの菌体を探った。

菌体をアルカリ変性法(2N NaOHで2分間処理した後、5M 酢酸アンモニアで

PrmRNA精製キット（ファルマシア）を用いてmRNAを精製した。

(3) モルモットのエオタキシンcDNA断片のクローニング

モルモット胸腺細胞から精製したmRNAの200ngについて、Ready-To-Go T-P  
rimed First-Strandキット（ファルマシア）を用いて一本鎖cDNAを合成した。

5 この一本鎖cDNAを錆型とし、プライマーとしてf42およびr53、耐熱性DNA  
ポリメラーゼとしてTaqを用いて、PCR反応（94°Cで1分間、50°Cで1分間、7  
2°Cで2分間を40サイクル）を行った。得られた反応液を制限酵素EcoRIで処理し、  
低融点アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ（約150bp）のDNAバ  
ンドを切り出し、Wizard PCR Preps DNA精製システム（プロメガ）を用いてDN  
A断片を精製した。得られたDNA断片を、EcoRIおよびウシ小腸アルカリホス  
10 フターゼ（CIAP；ファルマシア）で処理したpBluescript KS (+) ベクターに、  
DNAライゲーションキット（タカラ）を用いて挿入した。この挿入DNAの塩  
基配列を、AutoReadシーケンスキット（ファルマシア）およびALF DNAシーケ  
ンサーを用いて決定した。得られたモルモットのエオタキシンcDNA配列を、  
15 配列表の配列番号3に示す。

(4) モルモットのエオタキシンcDNAのクローニングおよび塩基配列の決定

PHAで30分間刺激したモルモット胸腺細胞由来の、上記(2)項で精製したm  
RNA 2 μgについて、SuperScript Plasmid System（ギブコBRL）を用いてcD  
NAを合成してクローニングベクターpSPORT 1に挿入した。得られたプラスミド  
20 を電気穿孔法で大腸菌（ElectroMAX DH10B、ギブコBRL）に導入し、21万クロー  
ン（4ml）のcDNAライプラリーを調製した。このcDNAライプラリーから  
エオタキシンcDNAをクローニングするための1次および2次スクリーニング  
は、PCR法で行った。この場合のプライマーは、上記(3)項で得られたモル  
モットのエオタキシンcDNA断片の塩基配列（配列表の配列番号3）に基づい  
て、22～45位に対応する正方向のeoFおよび103～126位に対応する逆  
25 方向のeoRを、上記(1)項と同様に合成して用いた。PCRは、Taqポリメラーゼを用いて、94°Cで1分間、58°Cで1分間、72°Cで2分間を30サイクルの反応で  
行った。1次スクリーニングでは、まず、cDNAライプラリー20μlずつのプ  
ール（約1000クローン）を96穴プレートに分注し、スーパープロス培地（1L中、

次いでメンプランをバイオイメージアナライザーで検出し、陽性のブラーク14個を選択した。この14個のファージDNAについて、既報の塩基配列に基づいてMCP-1とMCP-3の翻訳領域に対するPCRを行った結果、各1個が含まれていたのでこれを除いた。残り12個のファージについて、逐次希釈して2次および3次のスクリーニングを同様に行い、10個のシングルクローンを選択した。この10個のファージDNAについて、種々の制限酵素で切断してアガロース電気泳動で分離した。バンドのパターンが同じものは同一クローンとして、2クローンについて同様のハイブリダイゼーションを繰り返し、できるだけ小さいサイズの陽性バンドを与えるように制限酵素で切断した。この2クローンの陽性DNA断片をpBluescript KS(+)ベクターに挿入し、挿入DNAの塩基配列を決定した結果、いずれもヒトCCケモカイン遺伝子に特徴的な3エクソン／2イントロン構造(Baggioini, M.ら, Ad. Immunol., 55, 97-179 (1994))を有していた(2イントロンは、それぞれ、配列表の配列番号1の塩基配列の174位のGと175位のCとの間、および286位のTと287位のCとの間に存在していた)。2クローンの一方は既知のMCP-2であり、他方(クローン141)が新規のヒトCCケモカイン(ヒトエオタキシン)であった。ヒトエオタキシンのcDNA配列は、配列表の配列番号1に示すとおりである。

#### [実施例3] ヒトエオタキシンの各組織における発現

##### (1) プローブの作製

ヒトエオタキシンのヒト各組織における発現を検討するために、まず、以下のようにプローブを作製した。ヒトエオタキシングノム遺伝子の塩基配列に基づいて、第3エクソン部分に対応する正方向のDNA配列(配列表の配列番号1の288～309位に相当)および逆方向のDNA配列(配列表の配列番号1の483～504位に相当)をプライマーとして合成し、次のPCRに用いた。上記実施例2の(2)項で得られたクローン141のファージDNAを鑄型とし、Taqポリメラーゼを用いて、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間を30サイクルのPCR反応を行った。PCR反応物をアガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ(217bp)のDNAバンドを切り出し、Wizard PCR Preps DNA精製システムを用いてDNA断片を精製した。得られたDNA断片25ngを、Prime-It IIラ

中和してエタノール沈殿する)で処理して一本鎖プラスミドDNAを調製し、これを鋳型としてモルモットエオタキシンの翻訳領域を含むcDNAの塩基配列を、Sequenase 7-deaza-dGTPキット(Ver. 2.0)を用いてジデオキシ法により決定した。この結果、配列表の配列番号4に示すモルモットエオタキシンcDNAが得られた。

5 [実施例2]ヒトエオタキシングノムDNAのクローニング

(1) プローブの作製

モルモットエオタキシンcDNAの塩基配列(配列表の配列番号4)に基づいて、10位～33位のDNA配列に対する正方向のプライマーおよび316～339位のDNA配列に対する逆方向のプライマーを上記実施例1の(1)項と同様に合成し、次のPCRに用いた。上記実施例1の(4)項で得られたモルモットエオタキシンの一本鎖プラスミドDNAを鋳型とし、Taqポリメラーゼを用いて、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で2分間を30サイクルのPCR反応を行い、アガロース電気泳動で分離し、目的のサイズ(330bp)のDNAバンドを切り出し、Wizard PCR Preps DNA精製システムを用いてDNA断片を精製した。そのDNA断片25ngを、マルチプライムDNAラベリングシステムを用いて<sup>32</sup>P標識し、プローブとして用いた。

(2) ヒトゲノムライプラリーのクローニング

ファージベクターを用いたヒトゲノムライプラリー(ヒトリンバ球ゲノムライプラリー(λDASHベクター)、ストラタジーン)60万クローンを大腸菌(NM538)に感染させ、1次スクリーニングとして、LBプレート(1L中、トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、塩化ナトリウム10gを含む寒天培地)20枚に播いて、37℃で1晩培養してブラークを形成させた後、ナイロンメンプラン(Hybond-N+)にトランスファーした。このメンプランを30%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション液に浸して、42℃で2時間プレハイブリダイゼーションした後、上記(1)項で得られたプローブおよび30%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション液に浸して42℃で1晩ハイブリダイズした。メンプランの洗浄は、0.1%SDSを含む2×SSCに浸して、室温で10分間を2回および50℃で15分間を1回行った後、さらに0.1%SDSを含む0.5×SSCに浸して、50℃で15分間を1回行った。

析した）。その結果を図2に示す。MCP-1、MCP-2、およびMCP-3が最も類似しており（相同率64～65%）、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、I-309、およびRANTESとは32～36%の相同率であった。また、モルモットのエオタキシンとは57%の相同率であった。

## 5 [実施例6] ヒトエオタキシンペプチドの発現

### (1) 発現ベクターの構築

ヒトエオタキシンの塩基配列（配列表の配列番号1）に基づいて、翻訳領域を含むように正方向のプライマー（配列番号1の98～120位およびその5'側にNotI部位を付加）と逆方向のプライマー（配列番号1の369～392位およびその5'側にXbaI部位を付加）を合成した。これらのプライマーを用いて、上記実施例4で得られたプラスミドpYEU141を鋳型として、上記実施例2の(1)項と同様の条件でPCR反応を行った。その反応液を制限酵素NotIとXbaIで処理し、低融点アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ（約300bp）のDNAバンドを切り出して、Wizard PCR Prep DNA精製システムを用いてDNA断片を精製した。得られたDNA断片を、NotIとXbaIで処理したバキュロウイルストランスファーベクターpVL1392 (PHARMINGEN) に挿入し、pVL141を構築した。

### (2) ヒトエオタキシンペプチド発現

組換えベクターpVL141と、致死的な欠失を有する直線状のAcNPVのDNAとを、Sf9昆虫細胞に同時に導入し、組換えバキュロウイルスを得た。得られた組換えバキュロウイルスを、限界希釈法により純化し、さらに、Sf9昆虫細胞にM.O.I.=0.1で感染させて、種ウイルスを得た。この種ウイルスを、Tn5B-4昆虫細胞 (Invitrogen社) (150cm<sup>2</sup>のフラスコあたり1.2×10<sup>7</sup>個) にM.O.I.=10～20で感染させて、EX-CELL 400無血清培地 (JRH Biosciences社) (150cm<sup>2</sup>のフラスコあたり20ml) で、27℃で3日間培養した。その後、培養上清を回収し、0.22μmのフィルターメンブランで濾過した。この濾液を20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、150mM NaClに対して透析した。透析後の培養上清を、20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、400mM NaClで平衡化したHiTrap Heparin (ファルマシア社) にかけた。20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、600mM NaClで洗浄した後、20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、600mM NaClで溶出した。溶出画分の塩濃度を20mM Tris-HCl緩衝液

ンダムプライマーラベリングキット（ストラタジーン）を用いて<sup>32</sup>P標識し、プローブとして用いた。

#### （2）ヒト組織のノーザンプロット分析

種々のヒト組織mRNAを電気泳動で分離してトランスファーした市販のメンプラン（Human Multiple Tissue Northern Blot、クローンテック）および上記（1）項で得たプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行った。メンプランの洗浄は、0.1%SDSを含む2×SSCに浸して、室温で10分間を2回および55°Cで15分間を1回行った後、さらに0.1%SDSを含む0.5×SSCに浸して55°Cで15分間を1回行った。このメンプランをバイオイメージアナライザーで検出した。この結果を図1のAおよびBに示す。図中の矢印は、ヒトエオタキシンのmRNAのバンドの位置を示す。バンドの濃さから明らかのように、小腸>結腸>心臓の順に強いシグナルが得られた。

#### [実施例4] ヒトエオタキシンcDNAのクローニング

ヒト小腸cDNAライブラリー（ヒト小腸cDNAライブラリー（λMax1ベクター）、クローンテック）10万クローンを大腸菌（K802）に導入し、上記実施例3の（1）項で得たプローブを用いて、上記実施例2の（2）項と同様に1次から3次のスクリーニングを行い、2個のシングルクローンを選択した。この2クローンについて、ファージ（λMax1）DNAをプラスミド（pYEura3）DNAに挿入し、挿入DNAの塩基配列を上記実施例1の（3）項と同様に決定した。その結果、2クローンの一方のプラスミドpYEU141からは、ヒトゲノムライブラリーで推定した配列と一致するヒトエオタキシンの塩基配列（配列表の配列番号1）が得られた。なお、他方のクローンでは、1塩基の置換（配列表の配列番号1において、165位がG→A、アミノ酸23位がAla→Thr）が認められた。

#### [実施例5] ヒトエオタキシンのアミノ酸配列のホモロジー解析

ヒトエオタキシンの塩基配列に基づいて推定したアミノ酸配列（配列表の配列番号1）は、ケモカインに特徴的な4つのシステイン残基を含み、第1と第2のシステイン残基間に別のアミノ酸を含まないCCケモカインであると推定された。そのアミノ酸配列を、既知のヒトCCケモカインおよびモルモットエオタキシンの配列と比較した（データベースとしてGenbankを用い、DNASIS（日立）にて解

したがって、ヒトエオタキシンペプチドは、ヒト好酸球に対して、特異的に細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有することがわかった。

[実施例8] ヒトCCケモカインレセプターの発現

(1) ヒトCCケモカインレセプター発現ベクターの作製

既報の2種のヒトCCケモカインレセプターであるCC CKR1およびCC CKR2Bの遺伝子(Combadiere, C.ら、前出)をクローニングするために、ヒト単球細胞株THP-1のcDNAを用いて以下のようにPCR反応を行った。THP-1細胞のcDNA 500ngを錆型として用い、配列表の配列番号7および8に示すプライマーをCC CKR1の増幅のために、そして、配列表の配列番号9および10に示すプライマーをCC CKR2Bの増幅のために、それぞれ500ngを用いた。反応を行うための酵素としてはTaqポリメラーゼ(宝酒造社)を用いた。反応を、94℃、3分で1サイクル行った後、94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で3分間の条件で35サイクル行い、さらに72℃で3分間の反応を行った。この反応で得られたCC CKR1およびCC CKR2Bの遺伝子断片を、それぞれpCRII(Invitrogen社)のTAクローニング部位へ組み込んだ。次に、CC CKR1およびCC CKR2Bのそれぞれの遺伝子断片の両端に、XbaIで消化される配列を付加するために、以下のようにPCR反応を行った。上記の反応で得られたプラスミドのそれぞれ1μgを錆型として用い、配列表の配列番号11および12に示すプライマーをCC CKR1の増幅のために、配列表の配列番号13および14に示すプライマーをCC CKR2Bの増幅のために用いた。反応を行うための酵素としてはExTaq(宝酒造社)を用いた。反応を、94℃で2分間、1サイクル行った後、94℃で30秒間、60℃で1分間、72℃で2分間の条件で10サイクル行い、さらに72℃で5分間の反応を行った。得られたCC CKR1およびCC CKR2BのDNA断片を、それぞれXbaI(宝酒造社)で消化した後、pEF-BOS(Mizushima, S.ら、Nucleic Acids Res., 18, 5322 (1990))のXbaI部位に組み込んだ。このようにして得られたプラスミドを、それぞれpEBCC CKR1およびpEBCC CKR2Bと命名した。

既報のCC CKR3遺伝子(Combadiere, C.ら、前出)をクローニングするために、ヒトゲノムDNAを錆型にPCR法を行った。ヒトゲノムDNA(CLONTEC社)100ngを錆型として用い、配列表の配列番号15および16に示すプライマーを用い

(pH 7.5)、300mM NaClになるように下げ、20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、300mM NaClで平衡化したHiTrap SPにかけた。そして、20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、300mM NaClから1M NaClまで塩濃度を高めて、約780mM NaClで溶出される画分を回収した。

5 ベプチドの濃度は、BCAキット (Pierce社) を用いて、ウシ血清アルブミンを標準物質として決定した。培養上清100mlから54 $\mu$ gの精製ヒトエオタキシンペプチドが得られた。混入しているエンドトキシン量を、Limulusアーベバ様細胞溶解アッセイ (QCL-1000、Bio Whitaker社) を用いて定量し、これは2 pg/ $\mu$ g以下であった。精製ヒトエオタキシンペプチドのN末端アミノ酸配列を、アミノ酸配  
10 列決定機 (島津社) を用いて決定したところ、Gly Pro Ala Xaa Val Pro Thrであった。このアミノ酸配列は、塩基配列から予測されたシグナルペプチド (配列表の配列番号1の1位のMetから23位のAla) が切断された後の、74個のアミノ酸からなる成熟型分泌ペプチドのN末端アミノ酸配列と一致した。

15 [実施例7] ヒトエオタキシンペプチドのヒト好酸球、好中球、および単球に対する生物活性

ヒト血液から常法により単離したヒト好酸球、好中球、または単球を、ダルベッコPBS(-)で洗浄した後、HACM緩衝液 (20mM Hepes、pH 7.4中に、125mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、0.5 mM グルコース、および0.025% BSAを含む) に3×10<sup>6</sup>個/mlで懸濁させ、さらにfura-2/AM (モレキュラー・プローブ) を0.3nmol/10<sup>6</sup>個になるように加え、37°Cで30分間インキュベートした。HACM緩衝液で洗浄した後、好酸球、好中球、または単球を同緩衝液に5×10<sup>6</sup>個/mlで懸濁した。得られた好酸球、好中球、または単球懸濁液各500 $\mu$ lに、ケモカインをそれぞれ加えたときの蛍光度の変化を、蛍光分光光度計 (LS50B、PERKIN EL MER) を用いて、励起波長340nmおよび380nm、蛍光波長510nm、レスポンス0.02秒で測定した。その結果を、340nmと380nmとの蛍光強度の比で図3に示す。ヒトエオタキシンペプチドでは、好酸球に対して陽性コントロールのMCP-3ペプチドと同様に蛍光強度の比の上昇が認められた。また、ヒトエオタキシンペプチドでは、ヒト好中球および単球に対しては蛍光強度の比の上昇は見られなかつたが、陽性コントロールのIL-8およびMCP-3ペプチドでは、蛍光強度の比の上昇が見られた。

増殖したウェルの細胞を、CC CKR3発現細胞株として細胞内カルシウム濃度測定用に用いた。

(3) 293T細胞でのCCケモカインレセプターの発現

ヒト胎児腎細胞株293T細胞 (DuBridge, R. B. ら、Mol. Cell Biol., 7, 379-38  
5 7 (1987))  $5 \times 10^6$  個を、10mlの10%FCSを含むD-MEM (GIBCO社) に懸濁し、直径  
10cmの細胞培養のシャーレー（岩城硝子社）で、37°C、10%炭酸ガス存在下で1  
日培養した。3種のCCケモカインレセプターの発現ベクター (pEBCC CKR1、pE  
BCC CKR2B、およびpEBCC CKR3) のDNAそれぞれ30 $\mu$ gを蒸留水25 $\mu$ lに溶解し  
た後、250mM 塩化カルシウム (ナカライトスク社) 500 $\mu$ lを添加した。DNAお  
10 よび塩化カルシウムの混合液に2×BBS溶液 (50mM BES (SIGMA)、280mM 塩化ナト  
リウム (ナカライトスク社)、および1.5mM リン酸水素二ナトリウム (ナカラ  
イトスク社) ) 500 $\mu$ lを添加した後、室温で25分間静置した。このように調製した  
DNA溶液を293T細胞を培養しているシャーレーに滴下し、35°C、3%炭酸ガス  
存在下で20時間培養し、細胞にDNAを導入した。DNA導入した細胞を、3ml  
15 のPBS (+) で2回洗浄した後、10mlの10%FCSを含むD-MEM (GIBCO社) を添加し、3  
7°C、5%炭酸ガス存在下で1日培養し、細胞内カルシウム濃度測定用に用いた。  
以下の実施例9に示すように、CC CKR1およびCC CKR2Bについては、それぞれの  
特異的リガンドであるMIP-1 $\alpha$ およびMCP-1の添加による細胞内カルシウム濃度上  
昇活性があったため、CCケモカインレセプターの発現が確認された。また、CC  
20 CKR3の発現については、CC CKR1およびCC CKR2Bと同じ細胞株を用いて同様の形  
質転換および培養を行ったことから、同様に発現していると考えられる。なお、  
CC CKR3のmRNAの発現については、ノーザンプロット分析にて確認した。

[実施例9] ヒトエオタキシンペプチドのヒトCCケモカインレセプターに対する生物活性

25 上記実施例8の(3)項で得た各ヒトCCケモカインレセプター (CC CKR1、C  
C CKR2B、およびCC CKR3) が発現している293T細胞を、ダルベッコPBS (-) で洗浄  
した後、HACM緩衝液 (20mM Hepes, pH 7.4中に、125mM NaCl、5mM KCl、1mM M  
gCl<sub>2</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub>、0.5mM グルコース、および0.025% BSAを含む) に3 $\times$ 10<sup>6</sup>個/  
mlで懸濁し、さらにfura-2/AM (モレキュラー・プロープ) を0.3nmol/10<sup>6</sup>個に

た。反応を行うための酵素としてはPfu (STRATAGENE) を用いた。反応を、94℃で3分間、1サイクル行った後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間の条件で40サイクル行い、さらに72℃で5分間の反応を行った。得られたCC CKR3の遺伝子断片をXbaI (宝酒造社) で消化した後、pBluescriptII KS(+)のXbaI部位に組み込んだ。このプラスミドをpBS CKR3と命名した。pBS CKR3をXbaIで消化して得られたCC CKR3のDNA断片を、pEF-BOSのXbaI部位に組み込んだ。このようにして得られたプラスミドを、pEBCC CKR3と命名した。

CC CKR3のDNA断片の両端にNdeIおよびXhoIで消化される塩基配列を付加するために、pEBCC CKR3 2 μgを鑄型とし、配列表の配列番号17および18に示すプライマーを、それぞれ1.25 μgずつ用いてPCRを行った。反応のための酵素としてはExTaq (宝酒造社) を用いた。反応を、94℃で2分間行った後、94℃で30秒間、55℃で1分間、72℃で2分間の条件で10サイクル行い、さらに72℃で5分間反応した。得られたCC CKR3の遺伝子断片をNdeIおよびXhoIで消化した後、pCGGS:tKNeo (Niwa, H.ら, Gene, 108, 193-200 (1991)) のNdeI-XhoI部位へ組み込んだ。このようにして得られたプラスミドをpCAN CC CKR3と命名した。

## (2) K562細胞でのCC CKR3の発現

30 μgのpCAN CC CKR3をSalIで制限酵素処理し、フェノール／クロロホルム抽出ならびにエタノール沈殿を行った後、20 μlのPBS(+)に溶解した。一方、1×10<sup>7</sup>個のヒト赤白血病細胞株K562細胞 (ATCC CCL243) を、180 μlのPBS(+)に懸濁した。エレクトロポレーション法をGene-Pulser (BIO-RAD社) を用いて以下のようにを行い、K562細胞へプラスミドDNAを導入した。0.4cmのエレクトロポレーションチャンバー (BIO-RAD社) にDNA溶液および細胞懸濁液を入れ、氷上で10分間静置した後、チャンバーをGene-Pulserにセットし、0.25kV、500 μFの条件下でエレクトロポレーションを行った。チャンバーをパルス後速やかに氷上で10分間静置した。エレクトロポレーションを行った細胞を、10%FCS (日研) を含むRPMI1640培地で5×10<sup>6</sup>個/mlになるよう懸濁し、37℃、5%炭酸ガス存在下で2日間培養した。次いで、10%FCS (日研) を含むRPMI1640培地に800 μg/ml GENETICIN (GIBCO社) を添加した培地に懸濁し、1×10<sup>5</sup>個/ウェルで96穴プレートに分注した。37℃、5%炭酸ガス存在下で培養を続け、GENETICIN耐性の細胞が

ビ一性皮膚炎において、病変部へ浸潤し、その浸潤には本発明のヒトエオタキシンペプチドのようなケモカインが関与していると考えられる。病変部へ浸潤した好酸球は、主要塩基性タンパク質 (MBP) または好酸球陽イオンタンパク質 (ECP) を放出し、寄生虫感染においては寄生虫に対する生体防御反応に関与する一方で、アレルギー性疾患においては組織を破壊して病状を重篤化する。

本発明のヒトエオタキシンペプチドは、好酸球に対して特異的な活性を有するため、好酸球が関与する寄生虫感染またはアレルギー性疾患の治療薬として、あるいはその探索に用いられ得る。また、ケモカインの活性が、N末端のアミノ酸残基からシステイン残基までの部分のアミノ酸を順次欠失させることにより変化することが明らかになっている。したがって、本発明のヒトエオタキシンの部分ペプチドは、ヒトエオタキシンペプチドの阻害剤となることが期待される。このようなペプチドは、ヒトエオタキシンペプチドの阻害剤として、すなわちアレルギー性疾患の治療薬として用いられ得る。

また、本発明によって提供されるヒトエオタキシン遺伝子およびヒトエオタキシンに対する抗体は、ヒトエオタキシン遺伝子の変異ならびにそのmRNAおよびペプチドの発現状態を解析するために有用であり、したがって、アレルギー性疾患の診断などにも有用である。さらに、本発明によって提供されるヒトエオタキシン遺伝子を、直接あるいは適当なベクターに挿入してエクスピボで培養細胞に導入した後に体内に投与することによる、ヒトエオタキシン遺伝子の異常にによる遺伝性疾患、各種の癌、寄生虫により引き起こされる疾患などを対象にした遺伝子治療を開発するために有用である。

さらに、本発明により提供されるヒトエオタキシンペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする方法によって、アゴニストまたはアンタゴニストを選択し得、これらもまた、ヒトエオタキシンペプチドの阻害剤として、すなわち寄生虫感染、癌、アレルギー性疾患の治療薬として用いられ得る。

なるように加え、37°Cで30分間インキュベートした。HACM緩衝液で洗浄した後、各CCケモカインレセプター発現細胞を同緩衝液に $5 \times 10^6$ 個/mlで懸濁した。得られたCCケモカインレセプター発現細胞懸濁液各500μlに、ケモカイン（ヒトエオタキシン、MIP-1α、またはMCP-1）をそれぞれ100nMになるように加えた5ときの蛍光度の変化を、蛍光分光光度計（LS50B、PERKIN ELMER）を用いて、励起波長340nmおよび380nm、蛍光波長510nm、レスポンス0.2秒で測定した。その結果を、340nmと380nmとの蛍光強度の比で図4に示す。

ヒトエオタキシンペプチドは、CC CKR3発現細胞に対してのみ蛍光強度の比の上昇が見られ、さらに、連続しての添加による蛍光強度の比が変化しない脱感作も認められた。また、ヒトエオタキシンペプチドは、他のCCケモカインレセプターであるCC CKR1およびCC CKR2Bに対しては、蛍光強度の比の上昇が認められなかった。なお、各レセプターに対する陽性コントロールであるMIP-1αおよびMCP-1ペプチドでは蛍光強度の比の上昇が認められた。したがって、本発明のヒトエオタキシンペプチドは、CC CKR3発現293T細胞に対して、特異的に細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有することがわかった。この結果より、本発明のヒトエオタキシンは、未だ特異的リガンドが不明であるCC CKR3の特異的リガンドであると考えられる。

また、CC CKR3を別の細胞であるK562細胞株に発現させた場合についても、上記と同様の方法で、種々のケモカインの添加による細胞内カルシウムイオン濃度の変化について測定した。この結果を図5に示す。本発明のヒトエオタキシンを添加した場合のみ、蛍光強度の比の上昇が見られ、ヒト白血球遊走活性を有するMIP-1α、RNATES、MIP-1β、MCP-1、およびMCP-3では、蛍光強度の比の上昇は全く認められなかった。また、本発明のヒトエオタキシンでは、脱感作も見られた。したがって、本発明のヒトエオタキシンペプチドは、CC CKR3発現K562細胞に対して、特異的に細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有することがわかった。

#### 産業上の利用可能性

血中に流れる好酸球は、寄生虫感染、アレルギー性疾患、特に喘息およびアト

	55	60	65	70	
	GAT ATC TGT GCC GAC CCC AAG AAG AAG TGG GTG CAG GAT TCC ATG AAG				356
	Asp Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys				
	75	80	85		
5	TAT CTG GAC CAA AAA TCT CCA ACT CCA AAG CCA TAAATAATCA CCATTTTG				409
	Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro				
	90	95			
	AACCAAACCA GAGCCTGAGT GTTGCCTAAT TTGTTTCCC TTCTTACAAT GCATTCTGAG				469
	GTAACCTCAT TATCAGTCCA AAGGGCATGG GTTTTATTAT ATATATATAT ATTTTTTT				529
10	TAAAAAAA CGTATTGCAT TTAATTATT GAGGCTTAA AACTTATCCT CCATGAATAT				589
	CAGTTATTAA TAAACTGTAA AGCTTGTGC AGATTCTTA CCCCCCTGGGA GCCCCAATTC				649
	GATCCCCGT CACGTGTGGG CAATGTTCCC CCTCTCCTCT CTTCCCTCCCT GGAATCTTGT				709
	AAAGGTCCCTG GCAAAGATGA TCACTATGAA AATGTCATTG TTCTTGTGAA CCCAAAGTGT				769
	GACTCATTAA ATGGAAGTAA ATGTTTTT AGGAATACAA AAAAAAAA AAAAAACAAA				829
15	AAAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA				859

## 配列番号 2

配列の長さ : 73

配列の型 : アミノ酸

20 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ベブチド

起源

生物名 : モルモット

配列

25 His Pro Gly Ile Pro Ser Ala Cys Cys Phe Arg Val Thr Asn Lys Lys

1	5	10	15	
---	---	----	----	--

Ile Ser Phe Gln Arg Leu Lys Ser Tyr Lys Ile Ile Thr Ser Ser Lys

20	25	30	
----	----	----	--

Cys Pro Gln Thr Ala Ile Val Phe Glu Ile Lys Pro Asp Lys Met Ile

## 配列表

## 配列番号 1

配列の長さ : 859

配列の型 : 核酸

5 鎮の数 : 二本鎮

トポロジー : 直鎮状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ヒト

10 配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 99..392

特徴を決定した方法 : E

配列

15	GCATTTTTC AAGTTTATG ATTTATTTAA CTTGTGGAAC AAAAATAAAC CAGAAACCAC CACCTCTCAC GCCAAAGCTC ACACCTTCAG CCTCCAAC ATG AAG GTC TCC GCA GCA	60 116
	Met Lys Val Ser Ala Ala	
	1                       5	
	CTT CTG TGG CTG CTG CTC ATA GCA GCT GCC TTC AGC CCC CAG GGG CTC	164
20	Leu Leu Trp Leu Leu Leu Ile Ala Ala Ala Phe Ser Pro Gln Gly Leu GCT GGG CCA GCT TCT GTC CCA ACC ACC TGC TGC TTT AAC CTG GCC AAT	212
	Ala Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn	
	10                   15                   20 25                   30                   35	
25	AGG AAG ATA CCC CTT CAG CGA CTA GAG AGC TAC AGG AGA ATC ACC AGT Arg Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser	260
	40                   45                   50	
	GGC AAA TGT CCC CAG AAA GCT GTG ATC TTC AAG ACC AAA CTG GCC AAG Gly Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys	308

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

## 5 起源

生物名：モルモット

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：49..339

## 10 特徴を決定した方法：E

配列

ACAAACCCAGA	AAACTATTGT	CACGCTGCAA	CCCATCTGAC	ACTGCACC	ATG AAA GTC	57
					Met Lys Val	
					I	
15 TCC	ACA GCG TTT CTG TGC	CTG CTC ACA GTC	TCT GCT TTC AGC	GCC		105
Ser	Thr Ala Phe Leu Cys	Leu Leu Leu Thr Val	Ser Ala Phe Ser Ala			
	5	10	15			
20 CAG	GTG CTC GCC CAT CCA GGT ATC CCA AGT	GCC TGC TGC TTT CGT GTG				153
	Gln Val Leu Ala His Pro Gly Ile Pro Ser Ala Cys	Cys Phe Arg Val				
25 ACC	AAT AAG AAG ATC TCC TTT CAG CGA CTG AAG AGC	TAC AAA ATA ATC				201
	Thr Asn Lys Lys Ile Ser Phe Gln Arg Leu Lys Ser Tyr	Lys Ile Ile				
	40	45	50			
30 GAC	AGC AGC AAA TGT CCC CAG ACA GCC ATT GTC TTT GAG	ATC AAA CCT				249
25 Thr	Ser Ser Lys Cys Pro Gln Thr Ala Ile Val Phe Glu	Ile Lys Pro				
	55	60	65			
70 GAC	AAA ATG ATA TGT GCG GAC CCC AAG AAG AAG TGG GTT	CAG GAT GCC				297
	Asp Lys Met Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val	Gln Asp Ala				
	75		80			

	35	40	45
	Cys Ala Asp Pro Lys Xaa Xaa Trp Val Gln Asp Ala Lys Lys Tyr Leu		
	50	55	60
	Asp Gln Ile Ser Gln Xaa Thr Lys Pro		
5	65	70	

## 配列番号3

配列の長さ : 149

配列の型 : 核酸

10 鎮の数 : 二本鎮

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : モルモット

15 配列

ATA CCA AGT GCG TGT TGC TTT CGT GTG ACC AAT AAG AAG ATC TCC TTT 48

Ile Pro Ser Ala Cys Cys Phe Arg Val Thr Asn Lys Lys Ile Ser Phe

1 5 10 15

CAG CGA CTG AAG AGC TAC AAA ATA ATC ACC AGC AGC AAA TGT CCC CAG 96

20 Gln Arg Leu Lys Ser Tyr Lys Ile Ile Thr Ser Ser Lys Cys Pro Gln

20 25 30

ACA GCC ATT GTC TTT GAG ATC AAA CCT GAC AAA ATG ATA TGT GCC GAC 144

Thr Ala Ile Val Phe Glu Ile Lys Pro Asp Lys Met Ile Cys Ala Asp

35 40 45

25 CCC AA 149

Pro

## 配列番号4

配列の長さ : 339

CGCGTCGACA TGGAAACTCC AAACACCAC

29

配列番号 8

配列の長さ : 32

5 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

10 CGCGCGGCCG CTCAGAACCC AGCAGAGAGT TC

32

配列番号 9

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

15 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CGCGTCGACC ACAACATGCT GTCCACATCT

30

20

配列番号 10

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

25 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CGCTCTAGAT TATAAACCAAG CCCAGACTTC

30

AAG AAG TAC CTG GAC CAA ATA TCC CAA ACT ACA AAG CCG TAA 339  
Lys Lys Tyr Leu Asp Gln Ile Ser Gln Thr Thr Lys Pro  
85 90 95

## 5 配列番号 5

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

## 10 配列の種類 : 合成DNA

配列

GCGAATTCA T HCCNAGYGC i TGYTGYTT

28

## 配列番号 6

## 15 配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

## 20 配列

GCGAATTCTT NGGRTG i GCR CADATCATYT T

31

## 配列番号 7

配列の長さ : 29

## 25 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

5 配列

ACGTTCTAGA TTATAAACCA GCGGAGACTT CCTTCTC

37

配列番号 1 5

配列の長さ：3 8

10 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

15 GCTCTAGAGC CACCATGACA ACCTCACTAG ATACAGTT

38

配列番号 1 6

配列の長さ：3 2

配列の型：核酸

20 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGTCTAGACT AAAACACAAT AGAGAGTTCC GG

32

25

配列番号 1 7

配列の長さ：3 7

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

## 配列番号 1 1

配列の長さ : 3 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

5 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACGTTCTAGA GCCGCCATGG AAACTCCAAA CACCACAG

38

## 10 配列番号 1 2

配列の長さ : 3 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列の種類 : 合成DNA

配列

ACGTTCTAGA TCAGAACCCA GCAGAGAGTT CATGCTC

37

## 配列番号 1 3

20 配列の長さ : 3 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

25 配列

ACGTTCTAGA GCCGCCATGC TGTCCACATC TCGTTCTC

38

## 配列番号 1 4

配列の長さ : 3 7

## 請求の範囲

1. 配列表の配列番号1の24位のGlyから97位のProまでのアミノ酸配列またはその類似の配列を含む、ペプチド。
- 5 2. 配列表の配列番号1の1位のMetから97位のProまでのアミノ酸配列またはその類似の配列を含む、請求項1に記載のペプチド。
3. ヒト好酸球内のカルシウムイオン濃度を上昇させる、請求項1に記載のペプチド。
4. ヒト小腸に由来する、請求項1に記載のペプチド。
- 10 5. 請求項1～4のいずれかに記載のペプチドをコードするDNA分子。
6. 配列表の配列番号1の168位のGから389位のAまでなる塩基配列を有する、請求項5に記載のDNA分子。
7. 配列表の配列番号1の99位のAから389位のAまでなる塩基配列を有する、請求項5に記載のDNA分子。
- 15 8. 配列表の配列番号1の1位のGから859位のAまでなる塩基配列を有する、請求項5に記載のDNA分子。
9. 請求項5～8のいずれかに記載のDNA分子を有する発現ベクター。
10. 請求項9に記載の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。
11. 前記宿主が昆虫細胞である、請求項10に記載の形質転換体。
- 20 12. 請求項10に記載の形質転換体を培養してペプチドを产生する工程、および產生されたペプチドを培養培地から回収および精製する工程を包含する、請求項1～4のいずれかに記載のペプチドの製造方法。
13. 請求項1に記載のペプチドに対する单クローニング抗体。
14. 請求項13に記載の单クローニング抗体を用いることを特徴とする、請求項25 1に記載のペプチドの測定方法。
15. 請求項1に記載のペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする方法であって、該アゴニストまたはアンタゴニストを含むと推定される試料と該ペプチドに特異的なレセプターとを反応させ、その結合性および/または反応性を測定する工程を包含する、方法。

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACGTGCGGCC GCCATGACAA CCTCACTAGA TACAGTT

37

5

配列番号 1 8

配列の長さ：3 7

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACGTCTCGAG CTAAAACACA ATAGAGAGTT CCGGCTC

37



図1 A

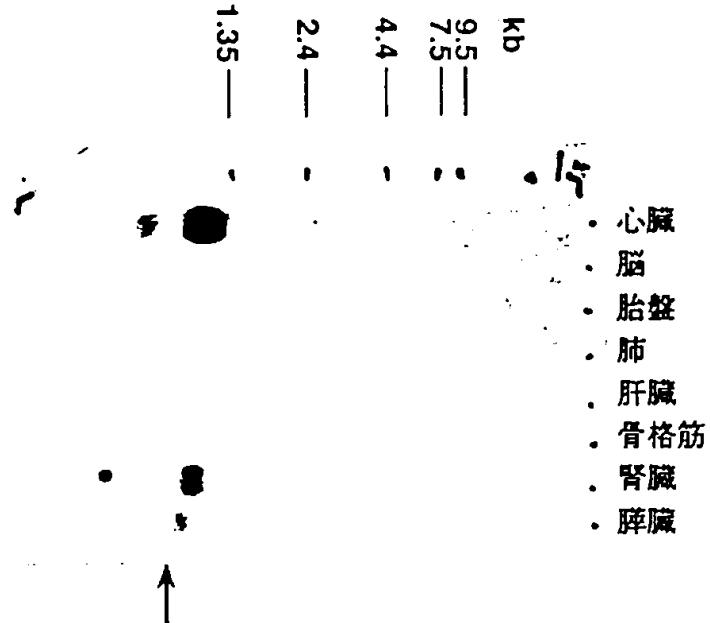


図1 B

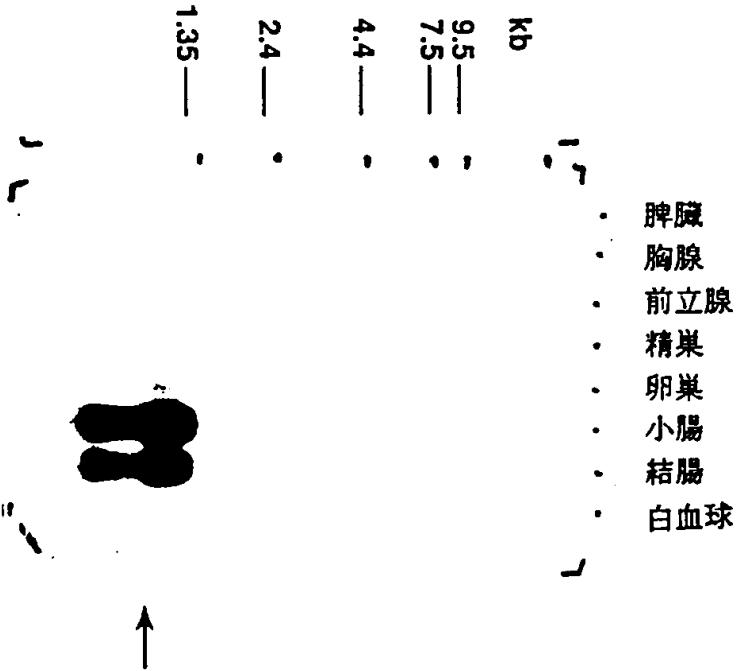


図 2

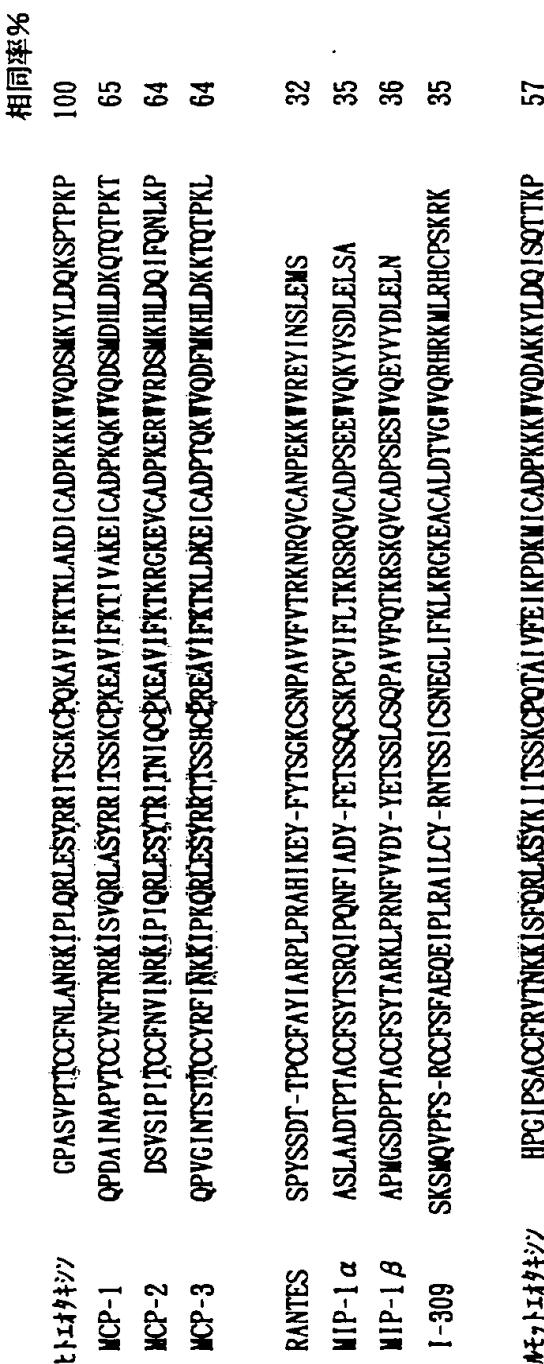


図 3

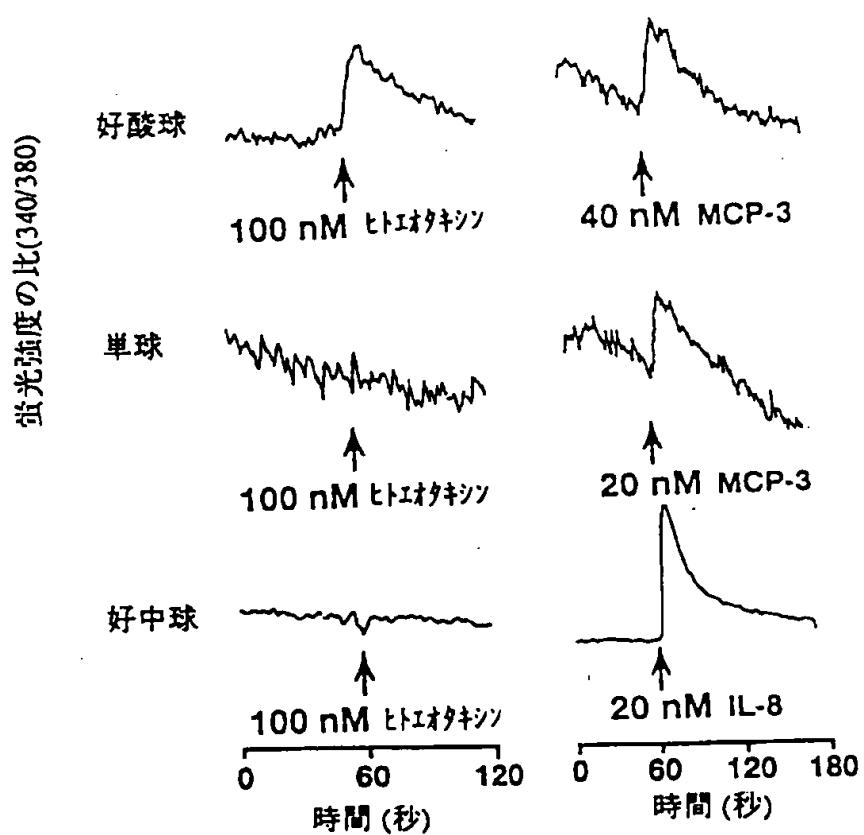


図 4

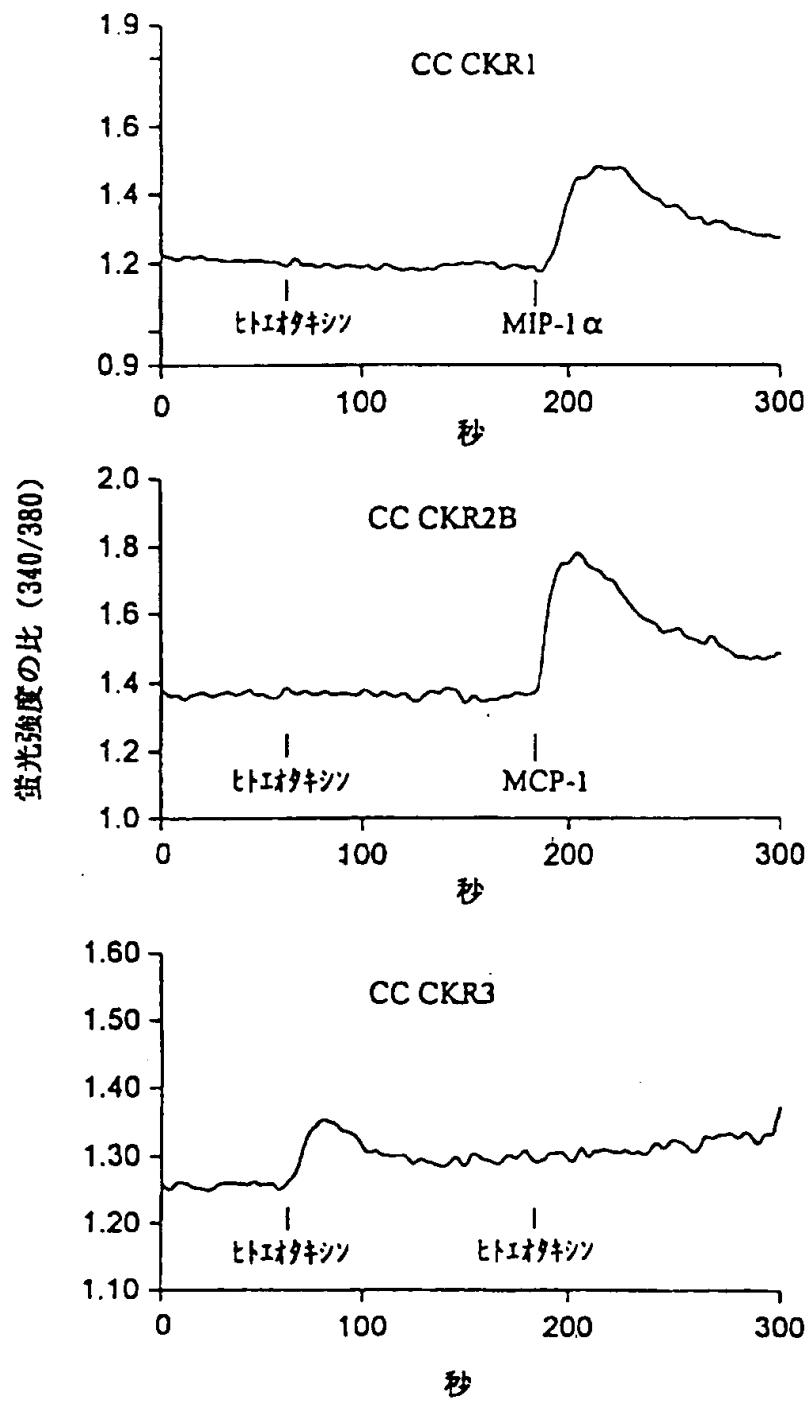
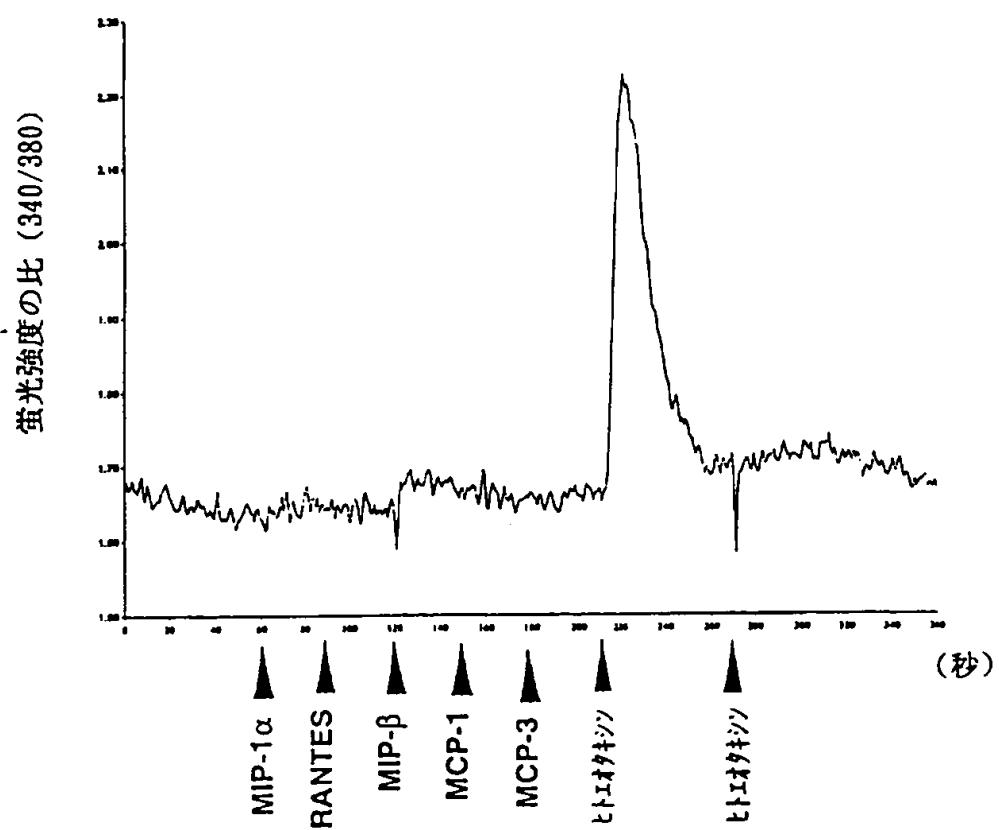


図 5

K562 CC CKR3 発現細胞株



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02851

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C07K14/52, C12N15/19, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/24,  
C12P21/08, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C07K14/00, C12N15/00, C12N5/00, C12P21/00, C07K16/00,  
C12P21/08, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 13, P. 7725-7730 (1996 March), M. Kitaura et al. "Molecular Cloning of Human Eotaxin, ...CC Chemokine Receptor 3"	1 - 15
P,X	Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 225, P. 1045-1051 (1996 Aug.), J. Bartels et al. "Human Dermal Fibroblasts Express Eotaxin ..."	1 - 15
P,X	J. Clin. Invest., Vol. 97, No. 3, P. 604-612 (1996 Feb.), P. D. Ponath et al. "Cloning of the Human Eosinophil Chemoattractant, Eotaxin"	1 - 15
A	Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 205, P. 788-794 (1994), P. J. Jose et al. "Eotaxin: Cloning of an Eosinophil Chemoattractant ..."	1 - 15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
January 7, 1997 (07. 01. 97)Date of mailing of the international search report  
January 14, 1997 (14. 01. 97)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office  
Facsimile No.Authorized officer  
Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/02851

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

C07K14/52, C12N15/19, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/24,  
C12P21/08, G01N33/53

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

C07K14/00, C12N15/00, C12N5/00, C12P21/00, C07K16/00,  
C12P21/08, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 13, P. 7725-7730 (1996 March) M. Kitaura et al. 「Molecular Cloning of Human Eotaxin, ... CC Chemokine Receptor 3」	1-15
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 225, P. 1045-1051 (1996 Aug) J. Bartels et al. 「Human Dermal Fibroblasts Express Eotaxin ...」	1-15
P, X	J. Clin. Invest., Vol. 97, No. 3, P. 604-612 (1996 Feb) P. D. Ponath et al. 「Cloning of the Human Eosinophil Chemoattractant, Eotaxin」	1-15
A	Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 205, P. 788-794 (1994) P. J. Jose et al. 「Eotaxin: Cloning of an Eosinophil Chemoattractant ...」	1-15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.01.97

国際調査報告の発送日

14.01.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

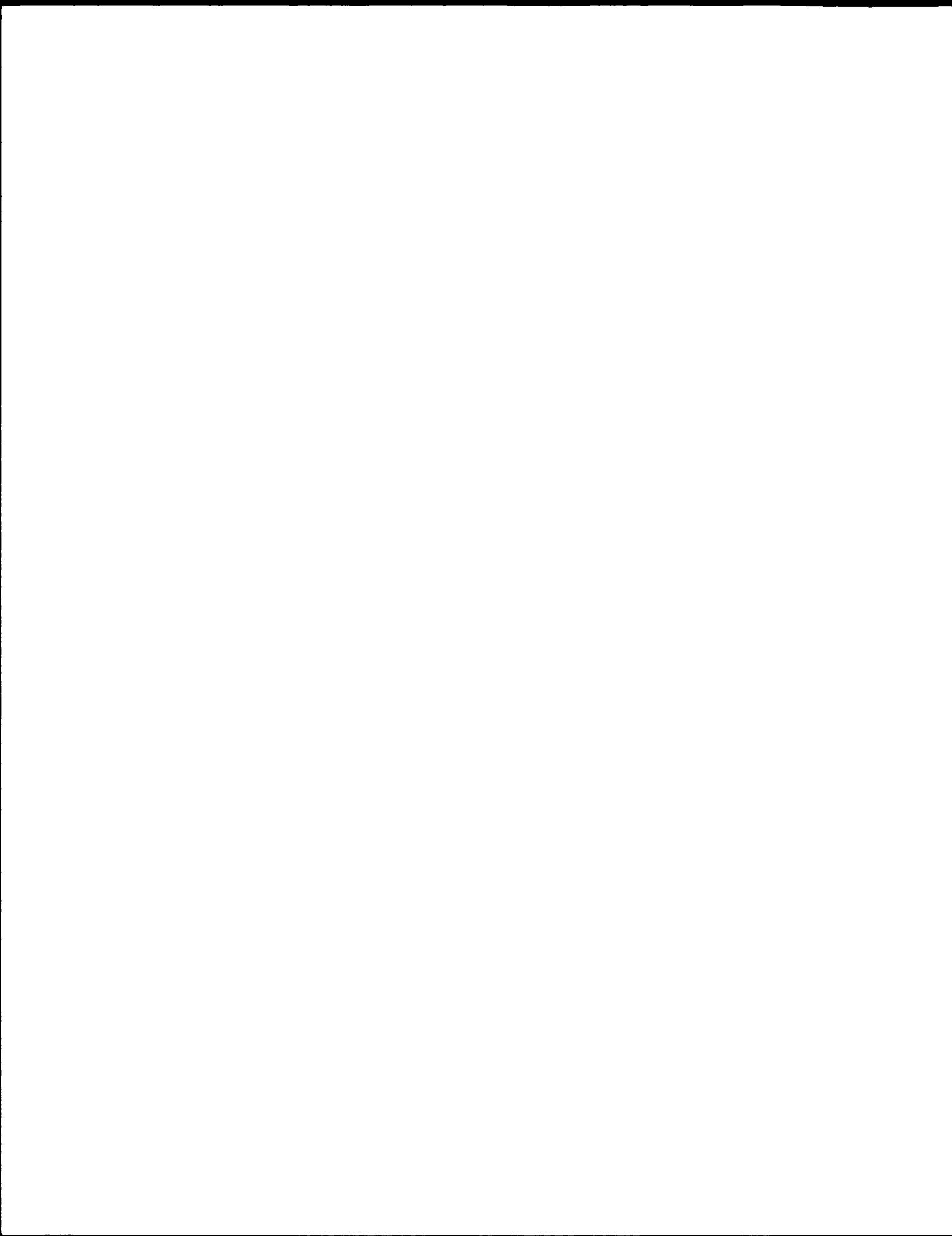
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員) -

斎見 浩一

印 4B 9162

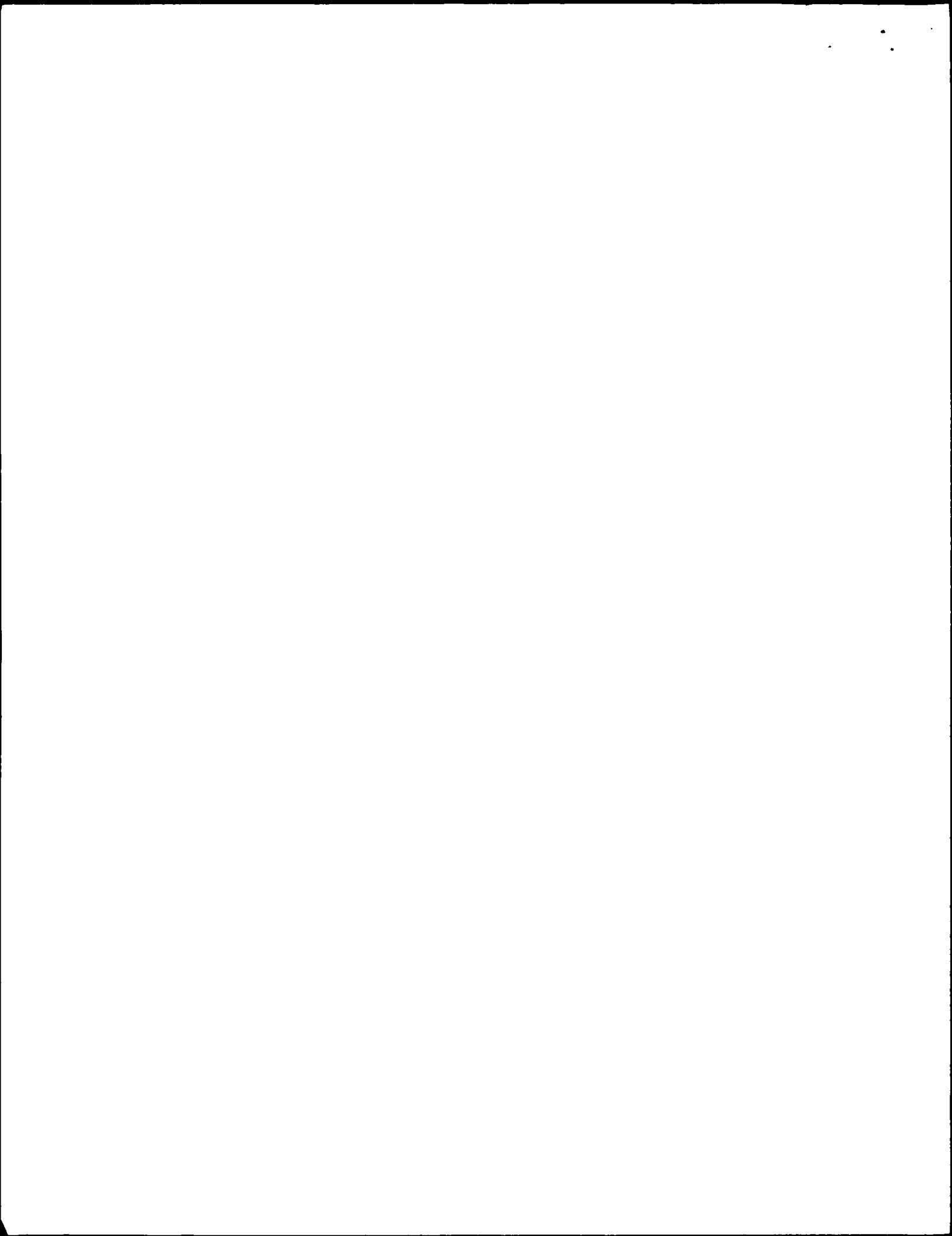
電話番号 03-3581-1101 内線 3448



**ID** **AAT62944**  
**CS** 576538d4b7b4e44219961c5f635138c4  
**IDH** AAT62944 standard; cDNA to mRNA; 859 BP.  
**MO** RNA  
**DV** RNA  
**DT1** 01-DEC-1997 (first entry)  
**DT** 01-DEC-1997  
**AK** **PATENT** WO9712914-A1  
**AK** PRIMARY AC AAT62944  
**EAK**  
**DR** P-PSDB AAW14990  
**DR** WPI 1997-226168/20  
**EDR**  
**DE** Human eosinocyte CC type chemokine eotaxin cDNA.  
**KW** CC type  
**KW** Human  
**KW** agonist  
**KW** allergy  
**KW** antagonist  
**KW** antibody  
**KW** assay  
**KW** asthma  
**KW** atopic  
**KW** calcium  
**KW** chemokine  
**KW** diagnosis  
**KW** disorder  
**KW** ds  
**KW** eosinocyte  
**KW** eotaxin  
**KW** inflammation  
**KW** screening  
**KW** skin  
**KW** small intestine  
**EKW**  
**OS** Homo sapiens.  
**SC** 4a22b9fcfbf65eca55a08e9eb4312eae  
**SP** HOMO SAPIENS  
**ESP**  
**INST** (SHIO ) SHIONOGI & CO LTD  
**CC** The present sequence encodes the human eosinocyte, CC type  
**CC** chemokine, eotaxin, which increases calcium flux in human  
**CC** eosinocytes and is a human analogue of guinea pig eotaxin. The  
**CC** eotaxin was derived from human small intestine, and is a specific  
**CC** agonist for human CC type chemokine receptor 3. It may be used to  
**CC** screen potential agonists and antagonists, which may be useful as  
**CC** anti-inflammatories. An anti-eotaxin antibody may be used in  
**CC** diagnostic assays for eotaxin, which is implicated in inflammatory  
**CC** disorders, e.g. asthma, other allergies and atopic skin  
**CC** inflammation.  
**ECC**  
**RN** 1 2385fac51869ca936c1b3b880c9fcd37  
**RC** PD: 10-APR-1997. PF: 01-OCT-1996; 96WO-JP02851. PR: 28-FEB-1996; 96JP-0041965. PR: 05-OCT-1995; 95JP-0259067.  
**RT** Human CC chemokine (eotaxin) active on eosinocytes - useful for screening for eotaxin (ant)agonist(s), e.g. for treating inflammation  
**RL** Patent: WO9712914-A1. Claim 7; Pages 27-28; 45pp; Japanese.  
**RA** Harada S. HARADA S  
**RA** Kitaura M. KITAURA M  
**RA** Nakajima T. NAKAJIMA T  
**ERN**  
**FK** CDS  
**LOC** 99..392



**ID** AAT62944 Contd.



NCBI-BLASTN 2.0.10 [Aug-26-1999]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= PF-0027US\_SEQ ID NO:1\_228187  
(291 letters)

Database: Geneseq.NA.2002AUG30  
2,085,897 sequences; 1,057,821,503 total letters

Searching.....done

Score (bits)	E Value
577	e-163
569	e-160
<b>GSEQ:AAT62944</b>	<b>Human eosinocyte CC type chemokine eotaxin cDNA</b>
569	e-160
547	e-154
GSEQ:AAT33527	Pancreas expressed chemokine-1 gene.
GSEQ:AAT58777	Human eotaxin cDNA.
GSEQ:AAT58777	Human eotaxin cDNA.
GSEQ:AAV05729	Nucleotide sequence of clone AM262_11.

>**GSEQ:AAT62944** Human eosinocyte CC type chemokine eotaxin cDNA.  
Length = 859

Score = 569 bits (287), Expect = e-160  
Identities = 290/291 (99%)  
Strand = Plus / Plus

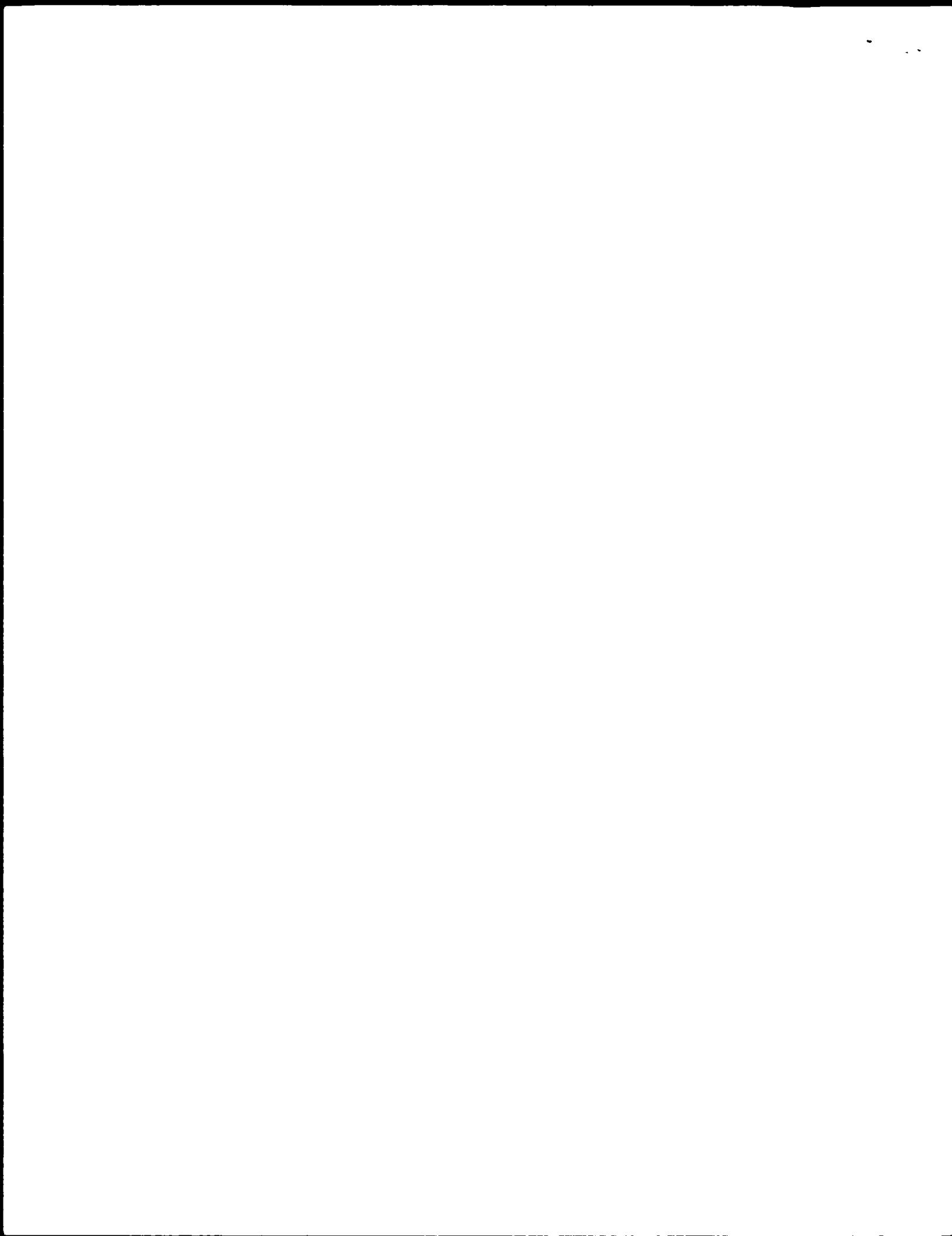
Query: 1 atgaaggtctccgcaggcacttctgtggctgctgctcatagcagctgccttcagccccag 60  
Sbjct: 99 atgaaggtctccgcaggcacttctgtggctgctgctcatagcagctgccttcagccccag 158

Query: 61 gggctcaactggccagttctgtccaaaccacacctgctgcttaacctggccaataggaag 120  
Sbjct: 159 gggctcgctggccagttctgtccaaaccacacctgctgcttaacctggccaataggaag 218

Query: 121 atacccttcagcgactagagagctacaggagaatcaccagtggcaaatgtccccagaaa 180  
Sbjct: 219 atacccttcagcgactagagagctacaggagaatcaccagtggcaaatgtccccagaaa 278

Query: 181 gctgtgatcttcaagacccaaactggccaaggatatctgtggccgaccccaagaagaagtgg 240  
Sbjct: 279 gctgtgatcttcaagacccaaactggccaaggatatctgtggccgaccccaagaagaagtgg 338

Query: 241 gtgcaggattccatgaagtatctggacccaaaatctccaaactccaaagcc 291  
Sbjct: 339 gtgcaggattccatgaagtatctggacccaaaatctccaaactccaaagcc 389



**GSEQ: AAT62944 Contd.**

Database: Geneseq.NA.2002AUG30  
Posted date: Sep 4, 2002 11:15 AM  
Number of letters in database: 1,057,821,503  
Number of sequences in database: 2,085,897

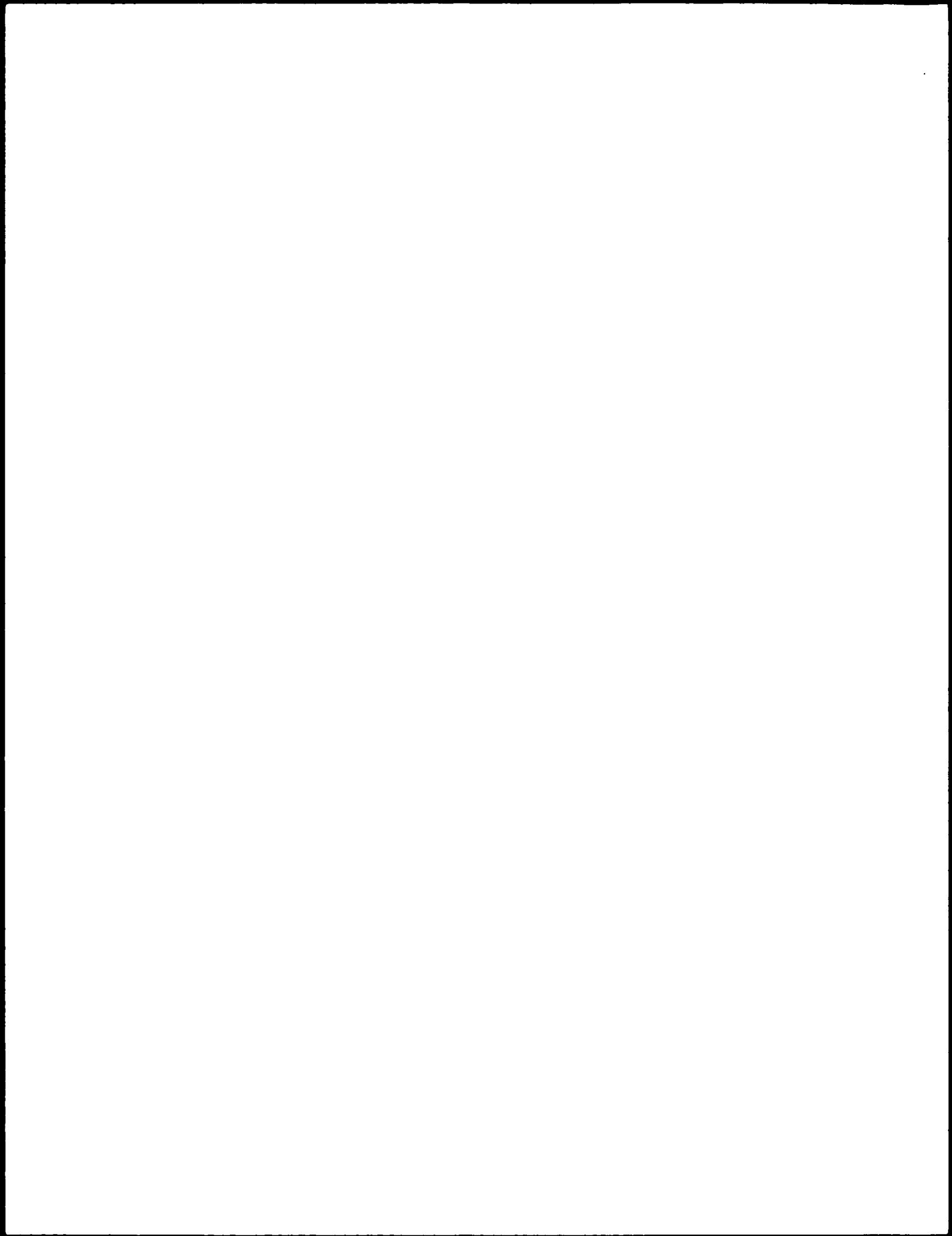
Lambda K H  
1.37 0.711 1.31

Gapped  
Lambda K H  
1.37 0.711 1.31

Matrix: blastn matrix:1 -3  
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2  
Number of Hits to DB: 210948  
Number of Sequences: 2085897  
Number of extensions: 210948  
Number of successful extensions: 65457  
Number of sequences better than 10.0: 201  
length of query: 291  
length of database: 1,057,821,503  
effective HSP length: 19  
effective length of query: 272  
effective length of database: 1,018,189,460  
effective search space: 276947533120  
effective search space used: 276947533120  
T: 0  
A: 0  
X1: 6 (11.9 bits)  
X2: 10 (19.8 bits)  
S1: 12 (24.3 bits)



**ID AAW14990**  
CS 013aebf1ca061e57d453fb43a907c12  
IDH AAW14990 standard; Protein; 97 AA.  
MO PRT  
DV PRT  
**DT1 01-DEC-1997 (first entry)**  
**DT 01-DEC-1997**  
**AK PATENT WO9712914-A1**  
AK PRIMARY AC AAW14990  
**EAK**  
DR N-PSDB AAT62944  
DR WPI 1997-226168/20  
**EDR**  
DE Human eosinocyte CC type chemokine eotaxin.  
KW CC type  
KW Human  
KW agonist  
KW allergy  
KW antagonist  
KW antibody  
KW assay  
KW asthma  
KW atopic  
KW calcium  
KW chemokine  
KW diagnosis  
KW disorder  
KW eosinocyte  
KW eotaxin  
KW inflammation  
KW screening  
KW skin  
KW small intestine  
**EKW**  
OS Homo sapiens.  
SC 4a22b9fcfb65eca55a08e9eb4312eae  
SP HOMO SAPIENS  
**ESP**  
**INST (SHIO ) SHIONOGI & CO LTD**  
CC The present sequence is the human eosinocyte, CC type  
CC chemokine, eotaxin, which increases calcium flux in human  
CC eosinocytes and is a human analogue of guinea pig eotaxin. The  
CC eotaxin was derived from human small intestine, and is a specific  
CC agonist for human CC type chemokine receptor 3. It may be used to  
CC screen potential agonists and antagonists, which may be useful as  
CC anti-inflammatories. An anti-eotaxin antibody may be used in  
CC diagnostic assays for eotaxin, which is implicated in inflammatory  
CC disorders, e.g. asthma, other allergies and atopic skin  
CC inflammation.  
**ECC**  
RN 1 ee51d5eeef40eb573304d83df3a0f33ff  
RC PD: 10-APR-1997. PF: 01-OCT-1996; 96WO-JP02851. PR: 28-FEB-1996; 96JP-0041965. PR: 05-OCT-1995;  
95JP-0259067.  
RT Human CC chemokine (eotaxin) active on eosinocytes - useful for screening for eotaxin (ant)agonist(s), e.g. for  
treating inflammation  
RL Patent: WO9712914-A1. Claim 2; Pages 27-28; 45pp; Japanese.  
RA Harada S. HARADA S  
RA Kitaura M. KITAURA M  
RA Nakajima T. NAKAJIMA T  
SQH Sequence 97 AA;  
SL 97 dbc82a8ea4a7c23db94f17bfbdd60e46  
SQ mkvsallwlliaafspqqlagpasvptccfnlanrkiplqrlesyrritsgkcpqk  
SQ avifktklakdicadpkkkwvqdsmkylqdqksptpkp  
ESQ



NCBI-BLASTP 2.0.10 [Aug-26-1999]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= PF-0027US\_SEQ ID NO:2\_228187  
(97 letters)

Database: Geneseq.AA.2002AUG30  
887,419 sequences; 130,709,309 total letters

Searching.....done

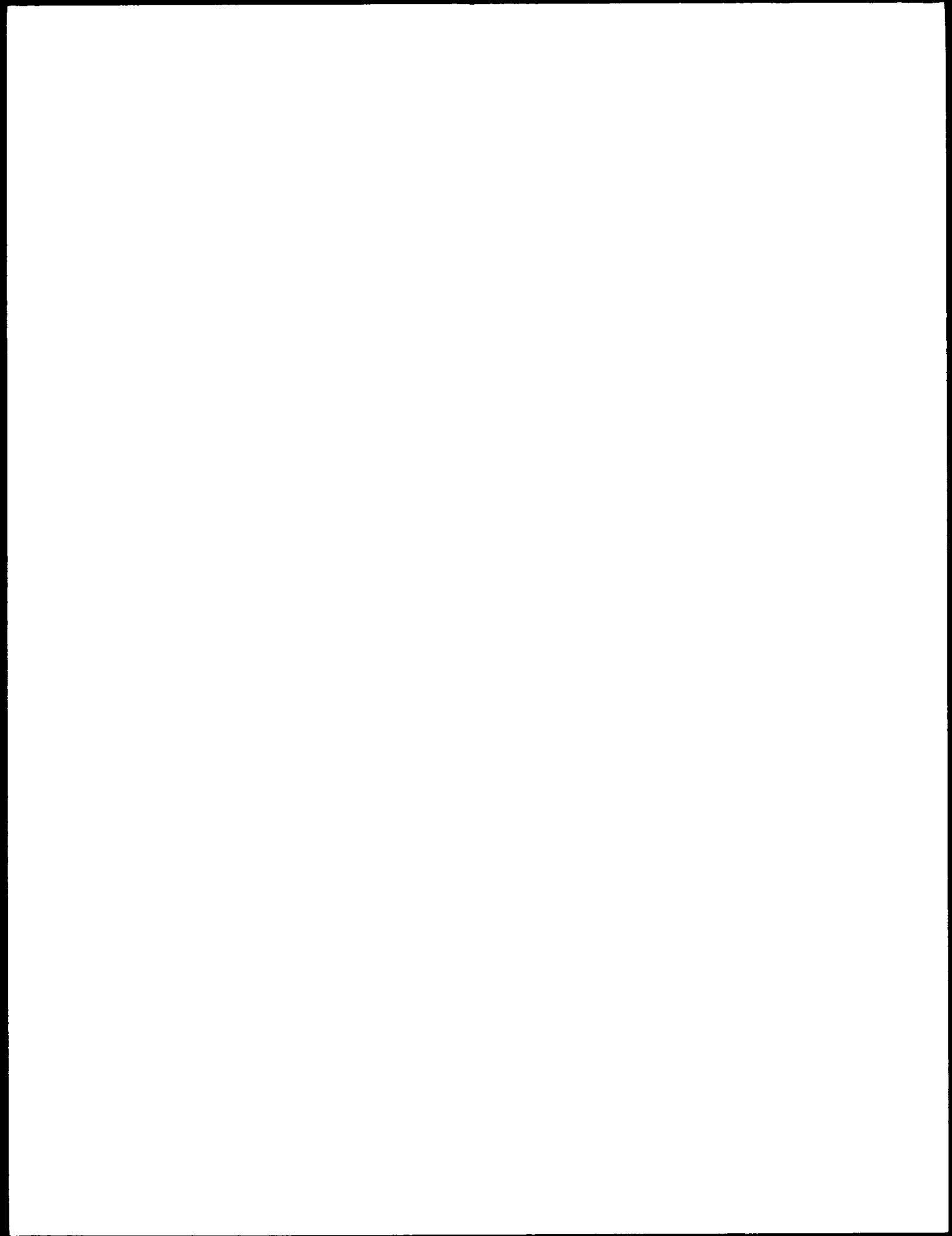
	Score (bits)	E Value
Sequences producing significant alignments:		
GSEQ:AAW00667 Pancreas expressed chemokine-1.	203	3e-52
GSEQ:AAW10099 Human eotaxin.	201	1e-51
<b>GSEQ:AAW14990 Human eosinocyte CC type chemokine eotaxin.</b>	201	1e-51
GSEQ:AAW44721 Amino acid sequence of the secreted protein enc	167	1e-41

> **GSEQ:AAW14990** Human eosinocyte CC type chemokine eotaxin.  
Length = 97

Score = 201 bits (505), Expect = 1e-51  
Identities = 96/97 (98%), Positives = 96/97 (98%)

Query: 1 MKVSAALLWLLLIAAAFPQGLTGPAVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQK 60  
MKVSAALLWLLLIAAAFPQGL GPASVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQK  
Sbjct: 1 MKVSAALLWLLLIAAAFPQGLAGPASVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQK 60

Query: 61 AVIFKTKLAKDICADPKKKWVQDSMKYLDQKSPTPKP 97  
AVIFKTKLAKDICADPKKKWVQDSMKYLDQKSPTPKP  
Sbjct: 61 AVIFKTKLAKDICADPKKKWVQDSMKYLDQKSPTPKP 97



**GSEQ:AAW14990 Contd.**

Database: Geneseq.AA.2002AUG30  
Posted date: Sep 4, 2002 9:25 AM  
Number of letters in database: 130,709,309  
Number of sequences in database: 887,419

Lambda K H  
0.320 0.133 0.413

Gapped  
Lambda K H  
0.270 0.0470 0.230

Matrix: BLOSUM62  
Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1  
Number of Hits to DB: 27383911  
Number of Sequences: 887419  
Number of extensions: 920834  
Number of successful extensions: 3814  
Number of sequences better than 10.0: 1205  
Number of HSP's better than 10.0 without gapping: 1120  
Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 85  
Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 2081  
Number of HSP's gapped (non-prelim): 1205  
length of query: 97  
length of database: 130,709,309  
effective HSP length: 48  
effective length of query: 49  
effective length of database: 88,113,197  
effective search space: 4317546653  
effective search space used: 4317546653  
T: 11  
A: 40  
X1: 16 ( 7.4 bits)  
X2: 38 (14.8 bits)  
X3: 64 (24.9 bits)  
S1: 41 (21.8 bits)

